



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Ciencias**

Departamento de Biología Molecular

**ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA REGIÓN 3' NO  
CODIFICANTE DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA.  
APLICACIÓN A NUEVAS ESTRATEGIAS VACUNALES  
BASADAS EN RNA**

TESIS DOCTORAL

Miguel Rodríguez Pulido

Madrid, 2009



Memoria presentada por Miguel Rodríguez Pulido para optar al grado de Doctor en  
Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.  
Madrid, Julio de 2009.



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en los Centros de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) y Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), bajo la dirección de la Dra. Margarita Sáiz Zalabardo.



*A Micaela*





## **Agradecimientos**

*Son muchas las personas a las que debería agradecer el trabajo presentado en esta tesis doctoral. Intentaré mencionar a todas aquellas que de alguna u otra manera, me han ayudado a que hoy esté escribiendo esta página.*

*Me gustaría comenzar mostrando mi gratitud a la directora de este trabajo, la Dra. Margarita Sáiz, por haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral, por su dirección y sus consejos. Gracias Marga, por la confianza que siempre has depositado en mí, por tu comprensión y todas las facilidades que me has brindado en estos años tan difíciles, dentro y fuera del trabajo.*

*Agradezco la financiación obtenida del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) mediante la concesión de una beca FPI “de tipo tecnólogo”, la financiación obtenida dentro del convenio de colaboración científica entre la empresa tecnológica (T.D.I.-SA) y Fundación Severo Ochoa (FSO), y a la financiación obtenida a través de la Fundación CReSA mediante la concesión de una beca predoctoral asociada al programa Consolider-Ingenio 2010.*

*Me gustaría agradecer enormemente al Dr. Francisco Sobrino todo su apoyo científico y técnico, así como a todos los miembros de su grupo de investigación por ser tan generosos y facilitarme cuanto he necesitado en el trabajo cotidiano. Aprovecho para agradecerle el haberme acogido en tu laboratorio y por todas las facilidades que me has ofrecido para continuar trabajando. Gracias Pachi.*

*Agradezco a la Dra. Encarnación Martínez-Salas por haberme acogido en su laboratorio el tiempo necesario para realizar la primera parte de este trabajo compartido con el de la Dra. Paula Serrano, como fruto de la colaboración científica establecida.*

*También me gustaría agradecer muy especialmente a la Dra. Belén Borrego toda su experiencia experimental y aportación científica en gran parte del trabajo presentado. Gracias Belén, no sólo por tu calidad científica, sino también por tu calidad humana. Siempre tuviste un momento para aconsejarme cuando lo necesité y un asiento libre en tu coche para llevarme a Madrid cuando se hacía tarde en el trabajo.*

*A Manuel Navarro (“Manu”) y a Paloma Fernández (“Paloma”), por haberme guiado en mis primeros pasos tan difíciles en Valdeolmos y por los buenos momentos compartidos tomando cervezas por Madrid. Gracias a ambos por hacerme más agradables tantas tardes fuera del trabajo. A Mónica González, muchísimas gracias por tu apoyo técnico e implicación en todo momento. Sois la gente que todo laboratorio le gustaría tener para sacar un trabajo adelante.*

*A la Dra. Mónica Gutiérrez, por haberme ayudado en mis comienzos cuando formábamos parte del laboratorio L-5 en Valdeolmos y más tarde en el CBM. Echo de menos tu compañía.*

*A todas las personas, en general, que en algún momento me ayudaron dentro o fuera del laboratorio.*

*Me gustaría hacer mención especial a mi apoyo incondicional y a la que debería dedicar un capítulo a parte. A la persona que siempre me entiende, me soporta y me da la razón cuando no la tengo. Gracias Angu por aguantarme durante tantos años, por ser tan comprensiva y paciente. Siento haber cambiado tanto mi forma de ser (yo también me he dado cuenta)... Espero recompensarte algún día.*

*Por último, me gustaría agradecer a mis padres todo lo que hicieron por mí. Gracias a mi padre por apoyarme y facilitarme cuanto he necesitado para que pudiera finalizar la carrera en esos momentos tan difíciles para todos.*

*Como no podía ser de otra manera, esta Tesis me gustaría dedicarla a la memoria de mi madre (Micaela).*





## Abreviaturas

ANOVA	análisis de la varianza
BHK-21	<i>Baby hamster kidney-21</i>
BSL-3	nivel 3 de bioseguridad
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i> (virus de la diarrea viral bovina)
cDNA	DNA copia
ConA	Concanavalina A
CPE	Efecto citopático
c.p.m.	cuentas por minuto
cre	“ <i>cis</i> -acting replication element” (elemento de replicación en <i>cis</i> )
CVB3	<i>coxsackievirus B3</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (medio Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	2'-desoxinucleótido-5'-trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilén diamino tetraacético
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i> (virus de la encefalomiocarditis)
EMEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i> (medio mínimo esencial de Eagle)
FBS	<i>Foetal bovine serum</i> (Suero fetal bovino)
FMDV	<i>Foot-and-mouth disease virus</i> (virus de la fiebre aftosa)
HAV	<i>Hepatitis A virus</i> (virus de la hepatitis A)
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> (virus de la hepatitis C)
HS	Heparán Sulfato
HRV-14	<i>Human rhinovirus 14</i> (rinovirus humano 14)
IE	Índice de Estimulación
IBRS-2	<i>Instituto biologico renale swine-2</i> (línea celular de origen epitelial derivada de riñón de cerdo)
IFN	Interferón
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (sitio de entrada interna del ribosoma)

iRNA	<i>Interference RNA</i> (interferencia de RNA)
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i> (virus de la coriomeningitis linfocítica)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complejo principal de histocompatibilidad)
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
MOI	Multiplidad de infección
MuMLV	<i>Murine moloney leukemia virus</i> (virus moloney de la leucemia murina)
NCR	<i>Non-coding region</i> (región no codificante)
nt	nucleótido
OPD	<i>O- Phenylenediamine dihydrochloride</i> (dihidrocloreuro de O-fenilenediamina)
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase de lectura abierta)
PABP	<i>Polyadenine binding protein</i> [proteína de unión a poli(A)]
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares de sangre periférica)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (solución salina tamponada con fosfato)
PCBP	<i>Poly(rC) binding protein</i> (proteína de unión a tramos de policitidina)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
p.d.	post-desafío
PFU	<i>Plaque forming unit</i> (unidad formadora de placa)
p.i.	post-inoculación
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> (forbol-12-miristato Acético)
PRN	<i>Plaque reduction neutralization</i> (reducción de placas en neutralización)
p.t.	post-transfección
PTB	<i>Polypyrimidine-tract binding protein</i> (proteína de unión a tramos de polipirimidina)
PV	Poliovirus
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i> (medio de cultivo desarrollado por Moore en este instituto)
RT	<i>Reverse transcription</i> (transcripción inversa)

RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR)
SDS	Dodecil sulfato sódico
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (RNA pequeño de interferencia)
SL	<i>Stem-Loop</i> (estructura secundaria de tipo tallo-bucle)
SLA-I / -II	<i>Swine leukocyte antigen I /II</i> (antígeno leucocitario porcino I/II)
SVDV	<i>Swine vesicular disease virus</i> (virus de la enfermedad vesicular del cerdo)
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i> (virus de la encefalitis transmitida por picaduras de garrapatas)
TCID	Dosis infectiva en cultivo celular
TMB	Tetrametil bencidina
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
UV	Ultravioleta
VLPs	<i>Virus-like particle</i> (partícula viral vacía)
WB	<i>Western Blot</i>
wt	<i>wild-type</i>

## **Código genético de una y tres letras**

Alanina	Ala, A
Arginina	Arg, R
Ácido Aspártico	Asp, D
Asparagina	Asn, N
Cisteína	Cys, C
Ácido Glutámico	Glu, E
Glicina	Gly, G
Glutamina	Gln, Q
Histidina	His, H
Isoleucina	Ile, I
Leucina	Leu, L
Lisina	Lys, K
Metionina	Met, M
Fenilalanina	Phe, F
Prolina	Pro, P
Serina	Ser, S
Tirosina	Tyr, Y
Treonina	Thr, T
Triptófano	Trp, W
Valina	Val, V







## INDICE

<b>1. RESUMEN EN INGLÉS</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>2.1. La fiebre aftosa</b>	5
<b>2.2. El virus de la fiebre aftosa</b>	6
2.2.1. Organización genómica	6
2.2.1.1. Región 5' no codificante	8
2.2.1.2. Región codificante	9
2.2.1.2.1. Precursor P1-2A	10
2.2.1.2.2. Región P2	10
2.2.1.2.3. Región P3	11
2.2.1.3. Estructura y función de la región 3' no codificante	12
2.2.2. Interacción virus-hospedador	14
<b>2.3. Control de la enfermedad</b>	15
<b>2.4. Nuevas estrategias vacunales frente a fiebre aftosa</b>	16
2.4.1. Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos	16
2.4.2. Cápsidas vacías	18
2.4.3. Vacunas basadas en DNA	19
2.4.4. Virus vivos atenuados	19
2.4.5. Estrategias antivirales y vacunas basadas en RNA	20
<b>2.5. Respuesta inmune frente a FMDV</b>	23
<b>3. OBJETIVOS</b>	29
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	33
<b>4.1. Líneas celulares y cultivo de células eucarióticas</b>	35
4.1.1. Líneas celulares	35
4.1.2. Medios y condiciones de cultivo	35
<b>4.2. Aislados virales de FMDV</b>	35
<b>4.3. Clones infecciosos de FMDV y subclones</b>	35
4.3.1. Clones infecciosos de FMDV y derivados	35
4.3.2. Subclones	36
<b>4.4. Preparación de extractos celulares</b>	37
<b>4.5. Ensayos de interacción RNA-RNA</b>	37

<b>4.6. Ensayos de interacción RNA-proteínas</b>	38
<b>4.7. Infecciones de monocapas celulares</b>	38
4.7.1. Infecciones en medio líquido	38
4.7.2. Plaqueos de virus en medio con agar semisólido	39
<b>4.8. Curva de crecimiento de virus</b>	39
<b>4.9. Síntesis y cuantificación de RNA</b>	39
<b>4.10. Transfecciones</b>	40
<b>4.11. Extracción de RNA viral</b>	40
4.11.1. Extracción a partir de monocapas transfectadas	40
4.11.2. Extracción a partir de sobrenadantes de células transfectadas o infectadas	41
<b>4.12. Secuenciación de genomas virales</b>	41
4.12.1. Amplificación por RT-PCR	41
4.12.2. Secuenciación	44
<b>4.13. Cuantificación de moléculas de RNA viral de polaridad positiva y negativa</b>	44
<b>4.14. Mutagénesis dirigida mediante PCR sobre un clon infeccioso de FMDV</b>	45
<b>4.15. Experimentación animal en ratón</b>	47
4.15.1. Titulación de virus en ratón lactante	47
4.15.2. Ensayos de virulencia en ratón lactante con transcritos de FMDV	47
4.15.3. Inoculación de ratón adulto con transcritos de FMDV	47
4.15.4. Desafío con FMDV de los ratones inoculados con RNA	48
4.15.5. Recogida y procesamiento de muestras de ratón adulto	48
<b>4.16. Experimentación animal en cerdo</b>	48
4.16.1. Ensayos de virulencia en cerdo con transcritos de FMDV	48
4.16.2. Inmunización de cerdos con transcritos de FMDV	49
4.16.3. Desafío con FMDV de los cerdos inoculados con RNA	49
4.16.4. Recogida y procesamiento de muestras de cerdo	49
<b>4.17. Detección de RNA viral en muestras animales</b>	50
<b>4.18. Cuantificación de genomas virales en suero</b>	51
<b>4.19. Secuenciación de virus a partir de de muestras de suero</b>	51
<b>4.20. Ensayos de aislamiento viral en células IBRS-2</b>	52

<b>4.21. Detección de anticuerpos específicos frente a proteínas</b>	
estructurales de FMDV mediante ELISA .....	53
<b>4.22. Detección de anticuerpos frente a 3ABC mediante ELISA .....</b>	<b>54</b>
<b>4.23. Detección de anticuerpos neutralizantes .....</b>	<b>54</b>
<b>4.24. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) .....</b>	<b>54</b>
<b>4.25. Ensayos de linfoproliferación .....</b>	<b>55</b>
<b>4.26. Detección de IFN-<math>\gamma</math> mediante ELISA .....</b>	<b>56</b>
<b>4.27. Análisis de expresión de IFN-<math>\gamma</math> mediante RT-PCR .....</b>	<b>56</b>
<b>4.28. Análisis estadístico .....</b>	<b>57</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1. Estudio de los mecanismos de interacción que median la relación</b>	
<b>funcional entre los extremos 5' y 3' del genoma de FMDV .....</b>	<b>63</b>
5.1.1. Interacciones a nivel RNA entre las 5' y 3' NCRs .....	64
5.1.2. Identificación y caracterización de proteínas celulares	
citoplásmicas que interaccionan con el fragmento S y la 3'NCR .....	66
5.1.2.1. Análisis del patrón de interacción con proteínas	
de extractos de células infectadas por FMDV .....	68
<b>5.2. Análisis mutacional de los motivos estructurales de la 3'NCR</b>	
<b>en cultivo celular .....</b>	<b>70</b>
<b>5.3. Caracterización del mutante O1K-<math>\Delta</math>SL1 en cultivo celular .....</b>	<b>72</b>
5.3.1. Análisis del fenotipo de placa .....	72
5.3.2. Cinética de crecimiento de virus .....	74
5.3.3. Capacidad replicativa .....	74
5.3.4. Estabilidad genética .....	76
<b>5.4. Análisis de la infectividad del RNA O1K-<math>\Delta</math>SL1 y progenie viral</b>	
<b>en ratón lactante .....</b>	<b>79</b>
<b>5.5. Generación de los plásmidos pO1K, pO1K-<math>\Delta</math>SL1, pO1K-<math>\Delta</math>SL2 y</b>	
<b>p<math>\Delta</math>3'NCR en versión VP3-H<sub>56</sub> .....</b>	<b>81</b>
5.5.1. Ensayos de infectividad en cultivo celular de los RNAs	
derivados de las construcciones O1K en versión VP3-H <sub>56</sub> .....	83
5.5.2. Ensayos de infectividad en ratón lactante de los RNAs	
derivados de las construcciones O1K en versión VP3-H <sub>56</sub> .....	85

<b>5.6. Análisis de la capacidad inmunogénica del RNA de FMDV en ratón</b>	
<b>adulto y respuesta protectora frente a virus infeccioso</b>	86
5.6.1. Ensayos con el RNA O1K/C-S8	87
5.6.2. Ensayos con el RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H <sub>56</sub> )	90
<b>5.7. Ensayos de infectividad del RNA de FMDV en cerdo</b>	92
5.7.1. Inoculación de cerdos con transcritos de RNA O1K/C-S8	92
5.7.1.1. Seguimiento clínico de los animales inoculados	92
5.7.1.2. Respuesta inmune inducida por la inoculación con RNA O1K/C-S8	94
5.7.2. Inoculación de cerdos con transcritos de RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H <sub>56</sub> )	94
5.7.2.1. Diseño experimental y seguimiento clínico de los animales inoculados	94
5.7.2.2. Análisis de viremia	95
5.7.2.3. Análisis de secuencia	97
5.7.3. Estimulación de la respuesta inmune en cerdos inoculados con RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H <sub>56</sub> )	98
5.7.3.1. Análisis de la respuesta humoral	98
5.7.3.1.1. Detección de anticuerpos neutralizantes frente a FMDV	98
5.7.3.1.2. Detección de IgA	99
5.7.3.2. Análisis de la respuesta celular	100
5.7.3.2.1. Respuesta linfoproliferativa	100
5.7.3.2.2. Detección de IFN- $\gamma$	101
<b>5.8. Ensayo de protección de los cerdos inoculados con RNA O1K-<math>\Delta</math>SL1     (VP3-H<sub>56</sub>) frente a desafío con virus infeccioso</b>	103
<b>6. DISCUSIÓN</b>	113
6.1. Interacciones RNA-RNA entre los extremos no codificantes del genoma de FMDV	114
6.2. Interacción de proteínas celulares con los extremos 5' y 3' del RNA viral de FMDV	115
6.3. Interacción de las NCRs de FMDV con proteínas presentes en extractos de células infectadas	117

6.4. Caracterización funcional de los elementos estructurales de la 3'NCR y del mutante de delección O1K-ΔSL1 .....	119
6.5. Capacidad inmunogénica del RNA de FMDV en ratón adulto y respuesta protectora frente a desafío con virus infeccioso .....	122
6.6. Infectividad del RNA de FMDV en cerdo .....	122
6.7. Ensayos del RNA O1K-ΔSL1 en ratón .....	123
6.8. Ensayos en cerdo y potencial vacunal del RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H <sub>56</sub> ) .....	124
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	133
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	139
<b>9. ANEXO</b> .....	171









## **RESUMEN**



## **1. SUMMARY**

Foot-and-mouth disease virus is a member of the *Picornaviridae* family and is considered as a major animal health problem worldwide affecting cloven-hoofed animals.

The virus consists of a non-enveloped particle enclosing a single-stranded positive-sense RNA molecule of about 8,5 Kb in length, which contains a single ORF flanked by two highly structured non-coding regions (5' and 3' NCRs, respectively). Previous work has proven the strict requirement of the 3' NCR for viral replication and infectivity, and its ability to stimulate the IRES-dependent translation, suggesting a functional link between NCRs.

In this Doctoral Thesis we have analyzed the function of the different structures forming the 3' NCR in the context of a full-length infectious clone with the aim to determine their involvement in the control of the replication and translation processes of the viral genome and their relevance in the infectious cycle to develop a new genetic vaccine based on self-replicating but non infectious RNA.

We have found direct RNA-RNA interactions between NCRs, as well as interactions with cellular proteins, undergoing in some cases proteolitical cleavage during FMDV infection. These interactions likely play an important role in the viral cycle, suggesting that the 3' NCR could be a target for genetic engineering aimed to disrupt viral infectivity. In order to examine this possibility, independent deletions of the two predicted stem-loops (SL1 and SL2) in the 3' NCR were performed on an FMDV full-length infectious clone. Infectivity assays on cultured cells showed that SL1 was not essential for virus viability, unlike SL2. Mutant  $\Delta$ SL1 viruses showed a delayed induction of cytopathic effect forming small plaques, and exhibited a reduced growth capacity, compared with full-length virus. Deletion of SL1 in the FMDV 3' NCR generated viruses with down-regulated replication associated to a defect in negative-strand RNA synthesis.

With the aim to explore the potential of an RNA-based vaccine against foot-and-mouth disease using attenuated viral genomes, we demonstrated that full-length chimeric O1K/C-S8 RNAs inoculated into pigs generated infectious virus and induced disease in swine. In contrast, RNAs carrying the  $\Delta$ SL1 mutation on an FMDV O1K genome were innocuous for pigs but elicited a specific immune response including both, humoral and cellular responses.









# **INTRODUCCIÓN**



## **2. INTRODUCCIÓN**

### ***2.1. La fiebre aftosa***

La fiebre aftosa es una enfermedad vesicular sistémica aguda, extremadamente contagiosa. Afecta a animales biungulados, tanto salvajes como domésticos, destacando cerdos, ovejas, vacas y cabras (Thomson G.R., 2003), aunque esta lista se podría extender a más de 70 especies diferentes (Coetzer J. A. W., 1994; Fenner F.J., 1993; Thomson G.R., 2003).

El agente etiológico de la enfermedad es el virus de la fiebre aftosa (“foot-and-mouth disease virus”, FMDV), uno de los patógenos más relevantes en sanidad animal a nivel mundial. El hecho de ser considerado el virus más transmisible (Pereira, 1981), junto con la enorme repercusión socio-económica de la enfermedad (Sobrinho & Domingo, 2001), ha llevado a la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) a considerarla como la principal enfermedad animal, de declaración obligatoria (<http://www.oie.int>). Ejemplo de sus devastadoras consecuencias son las últimas epizootias de Taiwan (1997) o Reino Unido (2001) (Knowles *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2002; Yang P.C., 1999).

La enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial (revisión en (Grubman & Baxt, 2004). En la actualidad España está libre de la enfermedad, aunque por la proximidad y relaciones con países en los que la enfermedad es endémica, existe un riesgo permanente de reintroducción. Aunque se han descrito varias vías de contagio, la principal vía de infección natural del ganado es la vía respiratoria, en la que las áreas faríngeas o el pulmón serían los sitios iniciales de replicación y posterior diseminación viral (Alexandersen *et al.*, 2003a).

Los síntomas clínicos dependen de la especie animal (Kitching, 2002; Kitching & Alexandersen, 2002; Kitching & Hughes, 2002), pero en general suelen observarse entre los 2 y 8 días tras la exposición al virus incluyendo la fiebre, diarrea, debilidad muscular, reducción de la movilidad, lesiones vesiculares en patas y cavidad oral (aftas), anorexia, etc, con las consiguientes pérdidas de peso y producción durante largos períodos de tiempo (Donaldson, 2004). Aunque su morbilidad es extremadamente alta, el índice de mortalidad es bajo, tanto en animales adultos como en jóvenes, salvo cuando se ven afectados de miocarditis (Timoney J. F., 1988). Mientras que en rumiantes se ha descrito que tras la fase aguda de la enfermedad puede establecerse una infección persistente, manteniéndose el virus en el tracto respiratorio

durante largos periodos de tiempo (Gebauer *et al.*, 1988; Salt J.S., 2004); (Zhang & Kitching, 2001). Los animales persistentemente infectados pueden constituir un reservorio natural para el origen de nuevos brotes, lo que representa una dificultad añadida para el control y erradicación de la enfermedad (Gebauer *et al.*, 1988; Salt, 1993; Van Bakkum J. G., 1959).

En los últimos años se han registrado numerosos brotes de fiebre aftosa en países que se consideraban libres de la enfermedad (Dunn & Donaldson, 1997; Ferguson *et al.*, 2001; Giles, 2001; Sobrino & Domingo, 2001). Como consecuencia, ningún país puede declararse en la actualidad a salvo de las repercusiones directas o indirectas de esta enfermedad.

### ***2.2. El virus de la fiebre aftosa***

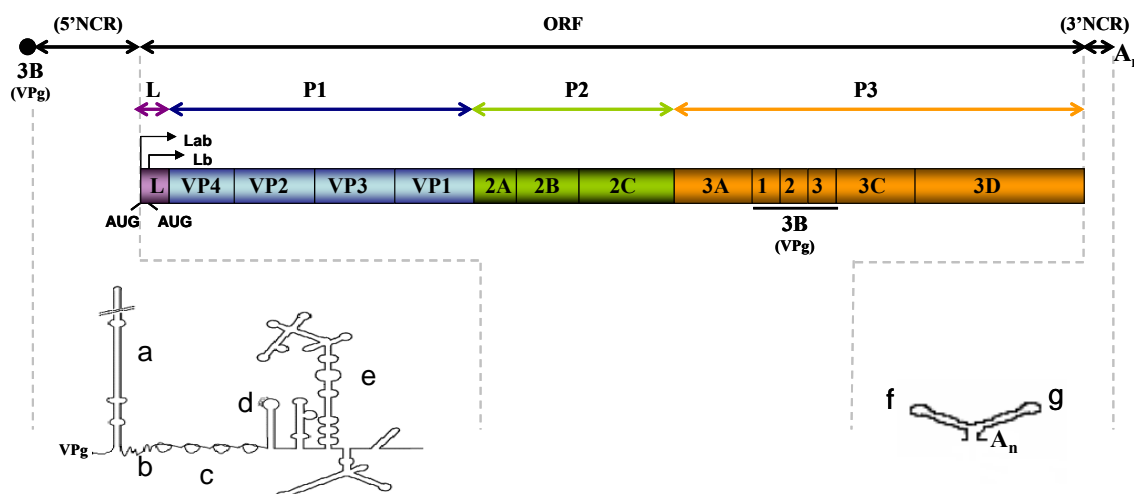
FMDV es el virus prototipo del género *Aphthovirus*, perteneciente a la familia *Picornaviridae*. El virus carece de envuelta y su genoma consiste en una única molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de unos 8.300 nucleótidos (nt) de longitud. Este genoma es englobado por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales codificadas por el virus 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3), 1D (VP1) (Rueckert & Wimmer, 1984) formando la cápsida, de simetría icosaédrica y unos 30 nm de diámetro (Acharya *et al.*, 1989; Wild *et al.*, 1969).

En función de su capacidad de inducir protección cruzada, se han descrito más de 65 subtipos y variantes antigénicas, clasificadas en siete serotipos distintos: A, C, O, Asia1, SAT1, SAT2 y SAT3 (Domingo, 1990; Knowles & Samuel, 2003; Pereira, 1976). Esta enorme variabilidad genética y diversidad antigénica del virus ha llevado a definir su estructura poblacional como una cuasiespecie (Domingo *et al.*, 2003; Domingo, 1990; Eigen, 1971; Eigen M., 1988). Este hecho constituye uno de los principales problemas para controlar la enfermedad mediante la vacunación (Barteling & Woortmeyer, 1987; Domingo, 1989).

#### ***2.2.1. Organización genómica***

El RNA viral tiene unida covalentemente la proteína viral VPg (3B) en su extremo 5' y una cola de poli(A) en su extremo 3' (Chatterjee *et al.*, 1976; Sangar *et al.*, 1977b) (ver figura 1). El genoma viral está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por dos regiones no codificantes (NCRs), altamente estructuradas (Belsham, 2004; Martinez-Salas *et al.*, 2002). Ambas regiones están separadas por una única fase de lectura abierta

(ORF) que codifica la poliproteína viral. Esta poliproteína, tras ser traducida, es procesada proteolíticamente por las proteasas virales:  $L^{pro}$ , 2A y  $3C^{pro}$ , dando lugar a las distintas proteínas maduras estructurales (VP4, VP2, VP3, VP1) y no estructurales (L, 2A, 2B, 3A, 3B, 3C y 3D) (Palmenberg, 1990).



**Figura 1. Organización genómica de FMDV.** La región codificante (ORF) está flanqueada por dos regiones no codificantes denominadas 5' y 3' NCRs. En el extremo 5' del RNA se encuentra unida covalentemente la proteína viral 3B (VPg). A continuación se localiza el fragmento S (a), un tramo de poli(C) (b) la región de “pseudoknots” (PKs) (c), el elemento *cre* (“cis-acting replication element”) (d) y el IRES (internal ribosome entry site) (e). La 3'NCR está estructurada en dos “stem-loops”: SL1 (f) y SL2 (g), junto con una cola de poli(A) genéticamente codificada por el virus.

El genoma de los virus de la familia *Picornaviridae* es infeccioso (Belsham & Bostock, 1988), por lo que no requiere de las proteínas virales para iniciar el ciclo infeccioso, que ocurre a nivel citoplasmático. En la primera fase del ciclo viral tiene lugar la traducción del RNA y origina todas las proteínas virales necesarias para llevar a cabo la replicación y la formación de la cápsida, generando nuevas partículas infecciosas (Grubman *et al.*, 1985; Guttman & Baltimore, 1977). En FMDV, la presencia de dos codones funcionales para iniciar la traducción permite generar dos formas alternativas para el componente N-terminal de la poliproteína viral, la proteasa L, (Lab o Lb) (Clarke *et al.*, 1985; Sangar *et al.*, 1987). Debido a que el virus emplea la maquinaria de la célula que infecta, es evidente la interacción entre proteínas celulares y virales, lo que causa una alteración en las funcionalidades de muchas de estas proteínas celulares. Estos cambios funcionales son los responsables de la inhibición del proceso traduccional y del bloqueo de los mecanismos de defensa de la célula hospedadora

(Belsham, 2005; 2004), facilitando la segunda fase del ciclo viral, la replicación, llevada a cabo por la RNA polimerasa dependiente de RNA (3Dpol). Los procesos de replicación y traducción, al no suceder de manera simultánea sobre la misma molécula de RNA molde, deben estar estrechamente regulados. La secuencia del genoma viral contendría todas las señales necesarias para estos procesos (Gamarnik & Andino, 1998).

### ***2.2.1.1. La región 5' no codificante***

Esta región tiene una longitud aproximada de 1.300 nt y en ella se localizan distintos elementos (Figura 1). El fragmento S es una región de unos 360 nt de longitud, cuyo análisis *in silico* predice la formación de una estructura secundaria tipo “stem” en forma de horquilla alargada (Clarke *et al.*, 1987; Escarmis *et al.*, 1992; Witwer *et al.*, 2001). Aunque su papel funcional y estructural no ha sido caracterizado en FMDV, se asume que es necesaria para la replicación por analogía con la estructura “cloverleaf” de poliovirus (PV), localizada en el extremo 5' de su genoma viral. La interacción de proteínas celulares y virales con esta estructura sugiere que pueda ejercer un papel en la regulación entre traducción y replicación (Gamarnik & Andino, 1998). Se ha propuesto que la circularización del genoma sería posible mediante puentes proteicos que aproximarían las NCRs del RNA regulando el cambio de traducción a replicación (Herold & Andino, 2001).

El tramo de poli(C) es una región de longitud variable y puede oscilar desde los 80 hasta los 400 nt (Brown F., 1974; Escarmis *et al.*, 1992; Harris & Brown, 1977). Aunque el significado biológico de su longitud no está claro, parece estar implicada en virulencia (de la Torre *et al.*, 1988; Diez *et al.*, 1990; Rieder *et al.*, 1993).

Adyacente al poli(C) se predice la presencia de 2 a 4 estructuras terciarias repetidas denominadas “pseudoknots” (PKs) en una región de aproximadamente 250 nt (Clarke *et al.*, 1987; Grubman *et al.*, 1984). La funcionalidad de estas estructuras se desconoce, pero podrían estar implicadas en el mantenimiento conformacional del extremo 5'NCR. Por otro lado, se ha sugerido que la funcionalidad de los PKs y del tramo de poli(C) podrían estar ligadas (Mandl *et al.*, 1998b).

A continuación, sobre una estructura tipo “stem-loop” de 55 nt de longitud aproximadamente, se localiza un motivo altamente estable denominado *cre* (“*cis*-acting replication element”). Este elemento es estrictamente necesario para la replicación del RNA viral y se ha demostrado que la inserción del *cre* “wildtype” (wt) en la 3'NCR es capaz de restaurar la capacidad replicativa de un RNA portador de un *cre* defectivo en

su 5'NCR (Mason *et al.*, 2002). A diferencia del resto de los miembros de la familia *Picornaviridae*, en los que el *cre* se ubica en la región codificante (Gerber *et al.*, 2001; Goodfellow *et al.*, 2000; Lobert *et al.*, 1999; McKnight & Lemon, 1998; Yang *et al.*, 2008), en el RNA de FMDV este elemento se localiza en la región 5' no codificante. El “loop” del *cre* contiene un motivo altamente conservado (AAACA) que actúa de molde para la uridilación de la proteína VPg (3B) en PV y rinovirus humano 14 (HRV-14) (McKnight & Lemon, 1998; Rieder *et al.*, 2000). A su vez, el producto VPg uridilado (VPgpU ó VPgpUpU) sirve de molde para la síntesis de la hebra negativa de RNA, esencial para la replicación (Paul *et al.*, 2003). Por la función específica de este elemento y su posible complementación en *trans*, se ha sugerido que el término *cre* podría ser reemplazado por *bus*, (“3B-uridylylation site”) (Tiley *et al.*, 2003).

Previo a los codones iniciadores, y solapando parcialmente con el *cre*, se encuentra el sitio de entrada interna del ribosoma (IRES), una región altamente estructurada que media la síntesis de proteínas virales de manera cap-independiente, de forma alternativa a la traducción llevada a cabo por la mayoría de los RNAs mensajeros (Belsham & Brangwyn, 1990; Kuhn *et al.*, 1990; Martinez-Salas & Fernandez-Miragall, 2004; Martinez-Salas *et al.*, 2002; Ramos & Martinez-Salas, 1999). El IRES de FMDV tiene una longitud de 462 nt y está estructurado en 5 dominios (1-5 ó G-L) (Belsham, 2004; Kuhn *et al.*, 1990). El alto grado de conservación filogenética de su estructura secundaria en un virus tan variable como FMDV apoya su relevancia. Se han identificado algunos motivos que son esenciales para mantener su actividad y organización estructural, así como para la interacción de algunas proteínas celulares (PTB, PCBP-2, ITAF<sub>45</sub>, eIF4G, eIF3 y eIF4B) (Martinez-Salas *et al.*, 2008).

### **2.2.1.2. Región codificante**

La mayor parte del genoma viral, 7.000 nt aproximadamente, corresponde a la región codificante de una única poliproteína de alrededor de 2.330 aminoácidos, cuya traducción puede comenzar en dos codones AUG funcionales, separados entre sí por 84 nt (Carroll *et al.*, 1984; Forss *et al.*, 1984). La poliproteína es posteriormente procesada por proteasas virales, dando lugar tras el procesamiento completo a 15 proteínas virales maduras que se engloban en 4 regiones denominadas: L, P1, P2 y P3 (Palmenberg, 1990) (ver Figura 1).

La proteasa “leader” (L) es la primera proteína traducida de la poliproteína viral. La estructura tridimensional en FMDV ha sido determinada (Guarne *et al.*, 1998) e

identificados los sitios catalíticos (Piccone *et al.*, 1995b; Roberts & Belsham, 1995). Aunque tiene dos formas alternativas, Lab o Lb, según el codón AUG iniciador empleado (AUG 1 ó AUG 2, respectivamente), se ha demostrado la preferencia por el segundo codón funcional para iniciar la traducción (Belsham, 1992). Mientras el AUG 1 no es esencial para la viabilidad del virus, modificaciones en el AUG 2 son deletéreas (Cao *et al.*, 1995). Ambas formas de la proteasa L pueden catalizar su escisión del resto de la poliproteína (L/P1) (Medina *et al.*, 1993) e inducir la proteólisis del factor de iniciación de la traducción (eIF4G) (Devaney *et al.*, 1988; Medina *et al.*, 1993). La proteólisis de eIF4G conduce a la parada traduccional (“shutoff”) en células infectadas, favoreciendo la traducción viral. Aunque la proteasa L no es necesaria para la viabilidad viral (Piccone *et al.*, 1995a), está implicada en el bloqueo de la expresión de interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) mediante su traslocación al núcleo de las células infectadas (de Los Santos *et al.*, 2006; Grubman *et al.*, 2008).

### ***2.2.1.2.1. El precursor P1-2A***

Este precursor se genera tras ser procesado el extremo N-terminal de la poliproteína viral por la proteasa L y el extremo C-terminal por la proteína 2A. Posteriormente, la proteasa 3C procesa el precursor P1-2A para escindir la proteína 2A de los distintos componentes de P1: VP0 (1AB), VP3 (1C) y VP1 (1D), para dar lugar finalmente a las cuatro proteínas estructurales maduras: VP4 (1A), VP2 (1B), VP3 (1C) y VP1 (1D), que integrarán la cápsida viral (Racaniello V.R., 2001; Rueckert R. R., 1996).

### ***2.2.1.2.2. La región P2***

La proteasa viral 3C también es la encargada de procesar el precursor 2BC para dar lugar a las proteínas 2B y 2C, que junto con la proteína 2A del virus integran la región P2 (Figura 1). La proteína 2A es un péptido de 16 aminoácidos de longitud y cataliza en *cis* la escisión de P1-2A de 2BC (Ryan & Flint, 1997; Ryan *et al.*, 1991).

Las proteínas 2B y 2C (154 y 318 aminoácidos, respectivamente) en FMDV están poco caracterizadas, disponiéndose de información relativa a enterovirus. Así, en células infectadas con PV, las proteínas P2 se encuentran en complejos de replicación viral asociados a membrana (Bienz *et al.*, 1987; Bienz *et al.*, 1990). La proteína 2B contiene dominios hidrofóbicos y ha sido relacionada con permeabilidad de membranas (Doedens & Kirkegaard, 1995) y secreción de proteínas (Van kuppeveld *et al.*, 1997).



Por otro lado, la proteína 2C contiene motivos de unión a nucleótidos trifosfato y de helicasas, aunque la actividad helicasa no ha sido demostrada experimentalmente. Esta proteína está implicada en la replicación del genoma viral, en la encapsidación y la reorganización de las estructuras intracelulares (Pfister T. and Wimmer E., 1999).

#### **2.2.1.2.3. La región P3**

La región P3 también es procesada por la proteasa viral 3C y codifica las proteínas no estructurales 3A, tres copias distintas de 3B (VPg), la proteasa 3C, y la RNA polimerasa viral (3D).

La secuencia de la proteína 3A de PV contiene motivos hidrofóbicos que hacen que ésta pueda anclarse a membranas, además de poder alterar su permeabilidad (Lama & Carrasco, 1995). También inhibe la secreción de proteínas celulares (Doedens & Kirkegaard, 1995) y está implicada en replicación del RNA viral (Bernstein *et al.*, 1985). Por otro lado, deleciones o alteraciones en la secuencia de 3A pueden afectar a la virulencia de FMDV y la patogenia de la enfermedad (Beard & Mason, 2000; Giraudo *et al.*, 1990) o contribuir a la expansión del rango de hospedador (Nunez *et al.*, 2001).

El RNA de FMDV tiene la particularidad de codificar tres copias no idénticas y funcionales de 3B (VPg) (King *et al.*, 1980). En cultivo celular se ha demostrado que virus con alguna copia de 3B delecionada tienen afectada la capacidad de sintetizar RNA (Falk *et al.*, 1992). Por otro lado, la uridilación de VPg en picornavirus es un evento necesario para iniciar la síntesis del RNA viral y ha sido demostrada mediante ensayos de uridilación *in vitro* en PV y HRV (Gerber *et al.*, 2001; Paul A.V., 2000). Los componentes necesarios para la uridilación *in vitro* de cada una de las copias de 3B de FMDV también han sido determinados, mostrando diferencias con respecto a PV. Este proceso en FMDV es estrictamente dependiente de la presencia del precursor viral 3CD, el *cre* y 3D, e independiente de la cola de poli(A) (Nayak *et al.*, 2005; Nayak *et al.*, 2006).

La proteína 3C también es la responsable de la proteólisis de algunas proteínas celulares como la histona H3 (Falk *et al.*, 1990; Tesar & Marquardt, 1990) o los factores del inicio de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham *et al.*, 2000).

Por último, la proteína 3D es la RNA polimerasa dependiente de RNA y es la responsable de la replicación del RNA viral, aunque los requerimientos específicos para el reconocimiento de las moléculas de polaridad positiva y negativa se desconocen. La estructura tridimensional de la 3D de FMDV ha sido experimentalmente determinada

(Ferrer-Orta *et al.*, 2006), aunque, a diferencia de PV, la región catalítica no ha sido identificada (Hansen *et al.*, 1997).

En picornavirus, algunos precursores de P3 (como 3CD) también participan en el ciclo infeccioso del virus (Belsham, 2005). Este precursor no sólo participa en la uridilación de VPg, sino que su interacción con la estructura “cloverleaf” de PV estimula la replicación viral (Gamarnik & Andino, 1997; Parsley *et al.*, 1997).

### ***2.2.1.3. Estructura y función de la región 3' no codificante***

Tras el codón de terminación de la poliproteína se encuentra la 3'NCR que consta de unos 90 nt de longitud, seguida de una cola de poli(A) de longitud variable (Chatterjee *et al.*, 1976; Sangar *et al.*, 1977a). El análisis estructural de esta región predice una organización en dos “stem-loops” (SLs) (Mason *et al.*, 2002; Witwer *et al.*, 2001).

En enterovirus se ha demostrado que virus con la 3'NCR (oriR) delecionada completamente son viables, sin generar cambios compensatorios en su genoma, mientras que distorsiones parciales en los dominios estructurales del oriR (Pilipenko *et al.*, 1992) generalmente provocan la pérdida de viabilidad (Brown *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 1997). Por otro lado, la interacción intramolecular entre los dominios X e Y del oriR también es crucial para una eficiente replicación del virus (Melchers *et al.*, 1997; Pilipenko *et al.*, 1996). La deleción específica del dominio Z en el oriR, en el caso de coxsackievirus B3 (CVB3) genera un virus infeccioso en cultivo celular pero con virulencia reducida en ratón, sugiriendo que el dominio Z juegue un papel relevante en replicación (Merkle *et al.*, 2002). Este dato correlaciona con la implicación del dominio Z en tropismo celular mediante su interacción en *cis* con el IRES (Dobrikova *et al.*, 2003). Igualmente, en enterovirus la deleción de la 3'NCR genera virus viables, a diferencia de la cola de poli(A), incluida en parte en la estructura SL del dominio X de este extremo, que sería un elemento necesario para la traducción y replicación eficientes (Zoll *et al.*, 2009). Estos resultados indicarían que en enterovirus, la iniciación de la replicación no es estrictamente específica de molde (Todd *et al.*, 1997).

Para otros géneros pertenecientes a esta misma familia, como *Rhinovirus* o *Cardiovirus*, deleciones parciales o mutaciones puntuales en su 3'NCR sí afectan seriamente a la capacidad replicativa del virus (Duque & Palmenberg, 2001; Mirmomeni *et al.*, 1997; Rohll *et al.*, 1995).

En el caso de FMDV, la 3'NCR es esencial para la replicación e infectividad viral. Su delección o sustitución por la región homóloga de un virus relacionado (virus de la enfermedad vesicular del cerdo, SVDV) impide que el virus pueda replicar y generar una infección productiva (Saiz *et al.*, 2001). Otro dato que apoya la relevancia funcional de esta región es su capacidad de estimular la traducción viral de manera independiente a la estimulación ejercida por el poli(A) (Lopez de Quinto *et al.*, 2002). Igualmente, se ha descrito un patrón de proteínas celulares que interaccionan con la 3'NCR de FMDV (Lopez de Quinto *et al.*, 2002).

Por otro lado, la relevancia de la cola de poli(A) en procesos del ciclo infeccioso en picornavirus también ha sido demostrada. En PV actúa como molde de inicio para la síntesis de la cadena negativa del genoma del virus a partir de la proteína 3B uridilada (3B-pUpU) (Paul A.V., 2000) y su capacidad de estimular la actividad traduccional del IRES ha sido descrita, además de en PV, en otros picornavirus como el virus de la encefalomiocarditis (EMCV), virus de la hepatitis A (HAV), y en un flavivirus, el virus de la hepatitis C (HCV) (Bergamini *et al.*, 2000; Svitkin *et al.*, 2001).

El efecto estimulador de la 3'NCR sobre la traducción IRES-dependiente sugiere el establecimiento de algún tipo de contacto entre los extremos 5' y 3' del genoma viral. Interacciones directas a nivel RNA mediante secuencias complementarias en el genoma han sido propuestas para flavivirus y demostradas por microscopía electrónica para el genoma del virus dengue (Alvarez *et al.*, 2005). En otros grupos de virus de RNA (+) se sugieren interacciones a través de puentes proteicos mediante proteínas de unión a RNA. En el caso de los enterovirus, la interacción de la proteína celular PCBP1-2 o bien del precursor viral 3CD con el "cloverleaf" del extremo 5' estimula la traducción o replicación, respectivamente (Gamarnik & Andino, 1998; Toyoda *et al.*, 2007). Así, la circularización del RNA viral sería necesaria para poder iniciar la síntesis de cadena negativa y facilitaría la transición traducción-replicación viral (Herold & Andino, 2001). Esta circularización estaría mediada por la interacción entre las proteínas celulares PCBP1-2 y PABP, que a su vez interaccionan con el "cloverleaf" y el poli(A) de los extremos 5' y 3' del genoma, respectivamente.

Toda la evidencia experimental acumulada indica la relevancia de la 3'NCR en el ciclo viral infeccioso, haciendo de esta región una posible diana para interferir en los procesos esenciales de expresión génica del RNA viral.

### **2.2.2. Interacción virus-hospedador**

Tras el procesamiento de la poliproteína viral, las proteínas estructurales de FMDV (una copia de cada), se ensamblan para formar un protómero. El ensamblaje de cinco protómeros forma un pentámero, y a su vez, doce pentámeros forman la cápsida (Yafal & Palma, 1979). La estructura tridimensional del virus, resuelta mediante cristalografía de rayos-X para los serotipos O, A y C, muestra que la proteína VP4 queda orientada internamente y las proteínas VP1, VP2 y VP3 quedan parcialmente expuestas hacia el exterior de la cápsida (Acharya *et al.*, 1989; Curry *et al.*, 1996; Lea *et al.*, 1994). Estas últimas comparten una estructura terciaria en forma de barril  $\beta$  compuesto por 8 cadenas  $\beta$  antiparalelas conectadas por bucles de longitud variable que definen la antigenicidad de cada serotipo (Jackson *et al.*, 2003).

El bucle G-H de VP1 contiene el principal sitio antigénico, implicado en la neutralización de la infectividad viral, aunque se han identificado otros sitios relevantes en la región P1 (Barnett *et al.*, 1989; Mateu *et al.*, 1990; Pfaff *et al.*, 1988; Xie *et al.*, 1987). En la zona central del bucle G-H de VP1 se localiza el triplete RGD (Arg-Gly-Asp), altamente conservado entre los aislados de distintos serotipos (Pfaff *et al.*, 1988). Este motivo RGD está implicado en la interacción con el principal grupo de receptores celulares de FMDV, las integrinas RGD-dependientes (Fox *et al.*, 1989; Surovoi *et al.*, 1988). La información disponible en la actualidad indica que FMDV infecta a sus hospedadores naturales via integrinas, no habiendo evidencia de uso de receptores alternativos *in vivo* (McKenna *et al.*, 1995; Neff *et al.*, 1998).

La adaptación del virus a cultivo celular puede seleccionar variantes que utilicen el glicosaminoglicano heparán sulfato (HS) como receptor (Jackson *et al.*, 1996; Sa-Carvalho *et al.*, 1997). En aislados de serotipo O<sub>1</sub> la presencia de un residuo de arginina, positivamente cargado, en la posición 56 de VP3, confiere afinidad por heparina y capacidad de unión a HS, ambas moléculas negativamente cargadas. La presencia de arginina en la posición 56 de VP3 se selecciona durante la adaptación del virus a cultivo celular y determina atenuación en bovino, a diferencia de virus con un residuo de histidina en esa posición (Jackson *et al.*, 1996; Jensen & Moore, 1993; Sa-Carvalho *et al.*, 1997).

La infectividad en líneas celulares que no expresan HS de variantes altamente pasados en cultivo, con mutaciones en el RGD, sugiere la existencia de un mecanismo alternativo, no caracterizado, para la entrada del virus en la célula de manera independiente de integrinas y HS (Baranowski *et al.*, 2000; Baranowski *et al.*, 1998).

Cambios en la secuencia de virus altamente variables genética y antigénicamente, como FMDV (Domingo, 1990; Domingo E., 2003), pueden afectar a la virulencia, la patogenia de la enfermedad, el rango de hospedador y el tropismo celular (Grubman & Baxt, 2004; Mason *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito que la tolerancia a mutaciones en el entorno RGD es distinta en cultivo celular e *in vivo*, dependiendo del contexto genético de la cápsida (Gutierrez-Rivas *et al.*, 2008).

### **2.3. Control de la fiebre aftosa**

La devastadora epizootia ocurrida en el Reino Unido en 2001 generó intensos debates sobre las ventajas e inconvenientes de la aplicación de las actuales vacunas ante un brote de la enfermedad. Las medidas sanitarias aplicadas cuando se declara un brote infeccioso están basadas en la inmovilización del ganado, rigurosas restricciones comerciales de animales y productos derivados, seguido del sacrificio de todos los animales infectados y expuestos (Sutmoller *et al.*, 2003). Ello implica, no sólo perder el estatus de “país libre de la enfermedad”, sino enormes pérdidas económicas (Scudamore & Harris, 2002; Thompson *et al.*, 2002; Yang P.C., 1999).

A pesar de los avances realizados a lo largo del último siglo en el desarrollo de una vacuna eficaz y segura para fiebre aftosa, aún no se ha conseguido solventar los numerosos inconvenientes que presenta la vacuna que se aplica en la actualidad (Doel, 2003).

La importancia de los anticuerpos neutralizantes para inducir protección frente a fiebre aftosa ha sido documentada ampliamente (Bachrach *et al.*, 1975; Bittle *et al.*, 1982; Kleid *et al.*, 1981; Laporte *et al.*, 1973; Strohmaier *et al.*, 1982). Los esfuerzos invertidos en desarrollos vacunales han estado dirigidos fundamentalmente a reproducir los niveles de anticuerpos específicos alcanzados en animales infectados. La vacuna actual frente a fiebre aftosa está basada en preparaciones parcialmente purificadas de virus inactivado químicamente (Bahnemann, 1972; 1975; Doel, 2003). Requiere revacunaciones sucesivas y no confiere protección cruzada entre serotipos (Barteling, 2004; Doel, 2003). Esta vacuna es capaz de inducir una respuesta humoral consistente, aunque menor que la inducida en animales infectados por virus sin inactivar (Barteling & Vreeswijk, 1991). Esta respuesta humoral correlaciona con la respuesta linfoproliferativa *in vitro* y con protección frente a FMDV, aunque efímera en el tiempo (Collen & Doel, 1990; Garcia-Valcarcel *et al.*, 1996; Saiz *et al.*, 1992).

La aplicación sistemática de programas de vacunación ha permitido reducir el número de brotes y la erradicación de la enfermedad en muchas partes del mundo (Brown, 1992). Sin embargo, la vacuna convencional contra la fiebre aftosa tiene ciertas limitaciones e inconvenientes:

- a) manipulación de grandes cantidades de virus durante el proceso de producción, que aumenta el riesgo de escape y requiere la producción en centros de alta seguridad biológica.
- b) riesgo de inactivación incompleta de la vacuna, convirtiéndola en una fuente potencial de posibles infecciones.
- c) necesidad de aplicar una cadena de frío para preservar la estabilidad del virus.
- d) problemas de diferenciación entre animales infectados y vacunados mediante tests serológicos.
- e) espectro de protección reducido por la falta de protección cruzada entre serotipos.
- f) falta de protección durante los primeros días post-vacunación, al no inducir una respuesta inmune rápida.

### ***2.4. Nuevas estrategias vacunales frente a fiebre aftosa***

Debido a los inconvenientes expuestos anteriormente, se están desarrollando numerosas estrategias alternativas dirigidas a la mejora de la inmunogenicidad y seguridad de las vacunas actuales. Las más relevantes se exponen a continuación.

#### ***2.4.1. Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos***

Las vacunas basadas en proteínas de la cápsida viral recombinantes, producidas en distintos sistemas de expresión en células procariotas, han sido una de las estrategias desarrolladas como alternativa a la actual vacuna. Su desarrollo evitaría la manipulación de las grandes cantidades de virus infeccioso que supone producir la actual vacuna. La inoculación en porcino y bovino de proteínas recombinantes (VP1 y VP3) resultó efectiva en la generación de una respuesta protectora frente a desafío con virus infeccioso (Kleid *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 2003).

La inoculación de péptidos sintéticos es otra de las estrategias empleadas para la generación de vacunas. Ensayos con péptidos que contienen el principal sitio antigénico de VP1 (Barnett *et al.*, 1989; Nargi *et al.*, 1999; Pfaff *et al.*, 1982; Xie *et al.*, 1987), o distintas regiones del polipéptido estructural (Mulcahy *et al.*, 1990; Steward *et al.*,

1991), indican que, si bien tienen capacidad inmunogénica en distintos hospedadores y animales susceptibles de infección por FMDV cuando son ensayados como vacuna, los niveles de anticuerpos inducidos sólo son suficientes para conferir una protección parcial (Bittle *et al.*, 1982; DiMarchi *et al.*, 1986; Rodriguez *et al.*, 2003).

La escasa inducción de la respuesta inmune mediada por células T sigue siendo uno de los factores que limita el uso de las vacunas basadas en subunidades (Collen, 1994; Sobrino *et al.*, 2001). A su vez, esta escasa respuesta celular correlaciona con los títulos de anticuerpos y la protección parcial inducida en los animales vacunados (Sanz-Parra *et al.*, 1999b). Aprovechando la capacidad de algunos epítomos virales para estimular la respuesta inmune mediada por linfocitos T (Blanco *et al.*, 2001; Collen *et al.*, 1991; Garcia-Briones *et al.*, 2004; Gerner *et al.*, 2007) se ha intentado mejorar la escasa respuesta celular diseñando péptidos dendriméricos (Lee *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2002). Recientemente, la asociación de cuatro copias de un epítomo antigénico B entorno a una única copia de uno de los epítomos T ha demostrado activar específicamente las células T e inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes y una respuesta de IgA, local y sistémica, en un hospedador natural (Cubillos *et al.*, 2008).

Aumentar la expresión de proteínas estructurales o epítomos de FMDV, con el objetivo de estimular la inducción de anticuerpos neutralizantes que mejore la respuesta inmune, ha sido otra de las estrategias consideradas en el diseño de nuevas vacunas (Dalsgaard *et al.*, 1997; Porta *et al.*, 1996; Porta *et al.*, 1994; Usha *et al.*, 1993; Yusibov *et al.*, 1997). Para ello, el empleo de plantas transgénicas o plantas infectadas con virus recombinantes que portan regiones estructurales de FMDV, como sistemas de expresión, ha permitido producir suficiente cantidad de proteína soluble en las células vegetales para poder usar los extractos foliares crudos como inmunógeno y tratar de mejorar la protección frente a virus infeccioso (Carrillo *et al.*, 1998; Dus Santos & Wigdorovitz, 2005; Wigdorovitz *et al.*, 1999).

Aunque algunas de estas estrategias son capaces de inducir niveles de anticuerpos significativos, no siempre son capaces de proteger al animal (Mulcahy *et al.*, 1990; Mulcahy *et al.*, 1992; Nargi *et al.*, 1999). En cualquier caso, la ausencia o los bajos títulos de anticuerpos, así como la insuficiente respuesta protectora en el animal, puede deberse a múltiples factores, como la ausencia de epítomos apropiados para inducir respuesta celular (Nargi *et al.*, 1999), falta de inmunodominancia en el hospedador por parte del epítomo antigénico elegido (Mateu *et al.*, 1995), variación antigénica del virus en animales persistentemente infectados (Haydon *et al.*, 2001), aparición de mutantes de

escape que constituyen variantes antigénicas del virus de desafío (Taboga *et al.*, 1997; Tami *et al.*, 2003), baja inmunogenicidad de la vacuna, que depende de su capacidad para exponer correctamente el epítipo (Crowther *et al.*, 1993), o simplemente, que la protección en el hospedador esté mediada por una respuesta celular y no sea tan dependiente de la respuesta humoral específica (Sanz-Parra *et al.*, 1998; van Bakkum, 1969).

### ***2.4.2. Cápsidas vacías***

La obtención de cápsidas vacías, inmunogénicas y estructuralmente similares a los viriones (VLPs), es otra de las estrategias que han sido desarrolladas frente a FMDV (Abrams *et al.*, 1995; Grubman *et al.*, 1985). No obstante, los bajos rendimientos obtenidos en los distintos sistemas de expresión empleados para producirlas dificultan su aplicación vacunal (Belsham *et al.*, 1991; Roosien *et al.*, 1990). En cualquier caso, los niveles de protección alcanzados con este sistema no son comparables a los obtenidos con la vacuna inactivada químicamente (Grubman *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1991).

### ***2.4.3. Vacunas basadas en DNA***

Las vacunas basadas en DNA también han sido otra de las alternativas desarrolladas para muchos agentes virales por su capacidad de inducir tanto una respuesta humoral como celular (Ulmer *et al.*, 1996; Ulmer *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1990). Así, plásmidos que expresan a) el genoma completo de FMDV (Ward *et al.*, 1997), b) el genoma con deleciones del sitio RGD, afectando su unión a receptores celulares (Beard *et al.*, 1999; McKenna *et al.*, 1995), c) combinaciones de epítopos B y T caracterizados para FMDV (Zamorano *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003), d) cápsidas vacías o distintas regiones del genoma de FMDV (Cedillo-Barron *et al.*, 2001; Chinsangaram *et al.*, 1998a; Chinsangaram *et al.*, 1998b; Jin *et al.*, 2007), co-administradas o no con plásmidos que expresan el factor estimulador de macrófagos-granulocitos porcinos (Bergamin *et al.*, 2007; Cedillo-Barron *et al.*, 2001; Lai & Bennett, 1998), son algunos de los candidatos analizados como vacunas DNA en hospedadores naturales de FMDV o en modelos animales (ratón o cobaya), produciendo anticuerpos específicos frente al virus.

Este tipo de vacunas presentan algunas ventajas con respecto a las estrategias anteriores, como su facilidad de producción o posibilidad de manipulación genética,



permitiendo modular la respuesta inducida en el hospedador (Restifo *et al.*, 2000). Sin embargo, su aplicación requiere reinmunizaciones sucesivas con altas dosis de antígeno para inducir niveles significativos de anticuerpos específicos neutralizantes frente a FMDV para ofrecer, en el mejor de los casos, una limitada inmunidad protectora en el hospedador natural (Beard *et al.*, 1999; Benvenisti *et al.*, 2001).

Con el fin de solventar este problema se han empleado distintas estrategias como dirigir la vía de presentación antigénica, fusionando péptidos señales a combinaciones de epítomos B y T (Borrego *et al.*, 2006) o estimulando la respuesta inmune innata en el animal incorporando secuencias CpG's en la secuencia de DNA que contiene el plásmido, dada su capacidad inmunoestimuladora (Kamstrup *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Sin embargo, ambas estrategias siguen sin resolver el inconveniente de los bajos niveles de anticuerpos inducidos, siendo necesaria la readministración de dosis elevadas de antígeno para inducir una respuesta inmune en el animal.

El empleo de vectores virales recombinantes es otra estrategia empleada frente a FMDV (Berinstein *et al.*, 2000; Grubman, 2005; Mayr *et al.*, 2001; Moraes *et al.*, 2002; Sanz-Parra *et al.*, 1999a; Yang *et al.*, 2007) con muy buenos resultados de estimulación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes y protección completa o parcial en animales vacunados con adenovirus recombinantes (Mayr *et al.*, 1999; Mayr *et al.*, 2001). Aunque con esta estrategia se han obtenido los mejores resultados en hospedadores naturales de FMDV, hasta la fecha sigue teniendo el inconveniente de no cubrir la ausencia de inmunidad durante los primeros días post-vacunación, al igual que el resto de estrategias desarrolladas, incluyendo la vacuna comercial actual basada en virus vivo inactivado. Para cubrir esta ausencia de inmunidad se ensayó el tratamiento con IFN por ser una de las primeras proteínas cuya expresión es inducida por el sistema inmune frente a una infección viral (Vilcek J, 1996). Así, se ha demostrado que la infección productiva de FMDV se inhibe en células pretratadas con IFN- $\alpha/\beta$  y que éste puede inducir una rápida respuesta protectora frente a FMDV (Ahl & Rump, 1976; Chinsangaram *et al.*, 2001; Chinsangaram *et al.*, 1999; Grubman & Baxt, 2004; Sellers, 1963). En este sentido, se ha descrito la protección “inmediata” de cerdos vacunados con una combinación de adenovirus que expresan IFN- $\alpha$  y una subunidad vacunal de FMDV, respectivamente (Chinsangaram *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2003).

#### **2.4.4. Virus vivos atenuados**

Distintas estrategias han sido desarrolladas para generar variantes de FMDV atenuados y poder ensayar su capacidad inmunogénica. La delección o mutación de regiones del genoma viral que están implicadas en el “shutoff” traduccional de la célula infectada (L<sup>pro</sup>) (Almeida *et al.*, 1998; Chinsangaram *et al.*, 1998b; Piccone *et al.*, 1995a) o implicadas en el reconocimiento de receptores (motivo RGD) (McKenna *et al.*, 1995) han sido algunas de ellas. No obstante, la selección de variantes virales que utilizan otros receptores alternativos (Baranowski *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003), riesgos de reversión a fenotipos virulentos o la incapacidad de inducir una buena respuesta inmune protectora en el animal (Chinsangaram *et al.*, 1998b; Mason *et al.*, 1997), son los principales inconvenientes de este tipo de estrategias.

Una vacuna viva atenuada basada en un recombinante portador de una delección de 30 nt en la 3'NCR, inmunogénico en humanos, ha sido propuesta frente al flavivirus dengue tipo 4 (Blaney *et al.*, 2006; Durbin *et al.*, 2001).

Recientemente, dos novedosos abordajes han sido aplicados a la generación de variantes atenuados estables de PV, ambos dirigidos a limitar su capacidad de reversión. El primero, basado en el control de la fidelidad replicativa de la polimerasa viral, ha permitido restringir la diversidad genética y reducir la patogenicidad en la población viral. Mediante esta estrategia se ha conseguido inducir una respuesta protectora en ratones transgénicos que expresan el receptor de PV (Vignuzzi *et al.*, 2008). La otra está basada en el uso preferente de unos codones sobre otros (“synonymous codon bias”) en el proceso de traducción, como resultado de la degeneración del código genético (Mueller *et al.*, 2006). La incorporación de mutaciones, que introducen codones empleados de manera subóptima en traducción en la región P1 del genoma de PV, ha permitido reducir la expresión del virus. Esta estrategia denominada “synthetic attenuated virus engineering” (SAVE), ha conseguido atenuar el virus y reducir su infectividad en ratón (Coleman *et al.*, 2008).

Recientemente se ha demostrado que la inserción de secuencias complementarias a miRNAs celulares en el genoma de PV restringe su tropismo, previene la patogenicidad y genera virus atenuados en cultivo celular y en ratón transgénico que expresa el receptor de PV (Barnes *et al.*, 2008). La aplicación como vacuna de virus regulados por miRNAs ha demostrado su capacidad de inducir una fuerte inmunidad protectora en ratones susceptibles (Barnes *et al.*, 2008).

### ***2.4.5. Estrategias antivirales y vacunas basadas en RNA***

El bloqueo específico de la expresión de los genes virales o la actuación directa sobre el genoma del virus son la base de algunas estrategias alternativas basadas en la tecnología del RNA que se están desarrollando frente a FMDV.

Moléculas de RNA complementarias (antisentido) dirigidas frente a las 5' y 3' NCRs del genoma de FMDV (Bigeriego *et al.*, 1999; Carrillo *et al.*, 2005; Rosas *et al.*, 2003) o frente al segundo codón iniciador de la traducción (Gutierrez *et al.*, 1993), fueron capaces de inhibir específicamente la producción de virus en cultivo celular. Sin embargo, no se dispone de ninguna información hasta la fecha de su aplicación en animales susceptibles a FMDV.

La inhibición de la replicación viral por interferencia de RNA (iRNA) es otra estrategia antiviral que ha sido ensayada frente a FMDV. La administración de pequeñas moléculas de RNA interferente (siRNA) es capaz de mediar la degradación específica de mensajeros de RNA y el silenciamiento génico específico (Bennink & Palmore, 2004; Bitko *et al.*, 2005; Haasnoot *et al.*, 2003; Hannon & Rossi, 2004; Meister & Tuschl, 2004; Mello & Conte, 2004; Novina & Sharp, 2004; Tijsterman *et al.*, 2002). siRNAs dirigidos frente a distintas regiones conservadas o esenciales del genoma de FMDV, sólo o en combinaciones moleculares, han demostrado ser capaces de inhibir específicamente la replicación del virus en cultivo celular y en ratón lactante (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004; Kahana *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2005). Los resultados de estos estudios sugieren que la administración de siRNA en combinación con la vacuna actual podría ser efectiva para inducir una respuesta antiviral rápida y duradera frente a FMDV. No obstante, la aplicación de este abordaje conlleva algunos inconvenientes, como la emergencia de mutantes resistentes, los posibles efectos secundarios y la forma de administración en animales a gran escala (Grubman & de los Santos, 2005).

El RNA, desnudo, vehiculizado con lípidos catiónicos, “gene gun”, vectores virales o transfectado en células dendríticas, también puede ser empleado para la introducción de genes exógenos que, expresados en las células, induzcan una respuesta inmune (Boczkowski *et al.*, 1996; Martinon *et al.*, 1993; Qiu *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1992; Wolff *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1994). Por otro lado, las vacunas basadas en RNA ofrecen algunas ventajas con respecto a las basadas en DNA (Pascolo, 2004; 2006), como son su capacidad auto-replicante, la ausencia del riesgo de integración en el genoma celular, la no inducción de respuesta autoinmune, su potencial inmunoestimulador, tanto en su forma de doble cadena como de cadena sencilla

estabilizada (Scheel *et al.*, 2004), además de la facilidad en cuanto a manipulación genética, sistemas de producción y procesos de purificación (Pascolo, 2004).

Estas ventajas que ofrece el RNA han hecho de éste un candidato ideal para diseñar estrategias dirigidas frente a una amplia gama de patologías, como el tratamiento terapéutico de algunas enfermedades humanas de origen tumoral o para inducir inmunidad frente a muchos agentes virales (Morse *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2001; Sullenger & Gilboa, 2002; Weide *et al.*, 2008).

Los virus cuyo genoma está formado por RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, infeccioso al ser introducido en células y animales susceptibles, son, por tanto, candidatos idóneos para el desarrollo de vacunas basadas en RNA que representen una alternativa a las actuales vacunas convencionales. En este sentido, TBEV o BVDV, ambos pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, son algunos ejemplos de virus RNA (+) para los que se han desarrollado estrategias vacunales basadas en RNA. Mientras que en el caso de TBEV se ha descrito la inducción de una repuesta inmune protectora en ratones inmunizados con virus y transcritos de RNA derivado de un clon infeccioso con deleciones parciales en la 3'NCR (Mandl *et al.*, 1998a; Mandl *et al.*, 1998b), en el caso de BVDV se demostró la inducción de títulos de anticuerpos neutralizantes en vacas y ovejas inmunizadas con transcritos de RNA de longitud completa derivados de un clon infeccioso utilizando “gene gun” (Mandl *et al.*, 1998a; Vassilev *et al.*, 2001).

La disponibilidad de clones infecciosos virales permite manipular su secuencia fácilmente mediante ingeniería genética. Así se ha conseguido la atenuación de variantes virales en flavivirus por modificación de regiones implicadas en el ciclo infeccioso del virus, como son la región estructural o la 3'NCR. La inoculación de ratones con transcritos de RNA derivados de un cDNA infeccioso de TBEV, que porta deleciones en su región estructural (Aberle *et al.*, 2005; Kofler *et al.*, 2004) o la deleción parcial de la 3'NCR (Mandl *et al.*, 1998a) es capaz de inducir una respuesta inmune (humoral y celular) protectora frente a desafío con virus infeccioso (Aberle *et al.*, 2005; Kofler *et al.*, 2004; Mandl, 2004).

En la actualidad, estrategias vacunales basadas en RNA han sido ensayadas para un único virus perteneciente a la familia *Picornaviridae*, CVB3. En este caso, el abordaje utilizado para generar la atenuación del RNA viral y ensayarlo en ratón, fue mutar puntualmente el sitio de corte entre las proteínas 2A y 2B (Hunziker *et al.*, 2004). A pesar de no detectarse anticuerpos en los animales, la inoculación con los transcritos mutantes fue capaz de inducir protección parcial frente a virus atenuado y una

supervivencia de los animales más prolongada tras desafío con CVB3 wt (Hunziker *et al.*, 2004).

### **2.5. Respuesta inmune frente a FMDV**

La inmunidad mediada por anticuerpos se identificó hace más de un siglo como el principal mecanismo de protección frente a la infección de FMDV. Así, se observó que la transferencia pasiva de suero de animales convalecientes que habían padecido la enfermedad, era capaz de proteger a animales expuestos al virus (Collen, 1994).

Como consecuencia de la replicación viral, la respuesta inmune (incluyendo respuesta humoral y celular) es estimulada específicamente e induce una eficiente protección frente a reinfecciones con virus homólogo o relacionados antigénicamente (Collen, 1994; McCullough *et al.*, 1992).

Los anticuerpos específicos IgM, seguidos de IgA e IgG, pueden ser detectados en fluidos del tracto respiratorio superior en animales infectados, incluso antes de desarrollar los síntomas de la enfermedad (Alexandersen *et al.*, 2003b; Eble *et al.*, 2007; Francis & Black, 1983). Sin embargo, los niveles de anticuerpos específicos en suero no se detectan hasta 4 días post-infección (IgMs), y entre 4-7 días las IgGs (Francis & Black, 1983; Salt, 1993; Zinkernagel *et al.*, 2001). Los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a los principales sitios antigénicos de la cápsida viral de FMDV (Kitson *et al.*, 1990; Lea *et al.*, 1994; Pfaff *et al.*, 1982; Strohmaier *et al.*, 1982), comienzan a detectarse en suero a partir de los 4-5 días post-infección (Collen, 1994). Finalmente, la enfermedad se resuelve en aproximadamente una semana, debido probablemente a la eficiente estimulación de la respuesta inmune, que finaliza en la inducción de una fuerte respuesta humoral (Bachrach H.L., 1977; Suttmoller & McVicar, 1976; van Bakkum, 1969). Esta fuerte inducción de anticuerpos detectables en suero generalmente correlaciona con la respuesta protectora inducida en el animal. No obstante, animales con títulos de anticuerpos significativos pueden no estar protegidos, mientras otros con títulos de anticuerpos neutralizantes bajos o nulos, pueden llegar a estarlo (McCullough *et al.*, 1992; Sobrino *et al.*, 2001). Esta falta de correlación ocasional ha sugerido la existencia de otros mecanismos del sistema inmune que expliquen la protección del animal en ausencia de anticuerpos neutralizantes detectables, como la estimulación de una respuesta inmune celular (Barnard *et al.*, 2005; Rigden *et al.*, 2003; Takamatsu *et al.*, 2006).

La inducción de una repuesta inmune humoral específica implica el reconocimiento de epítomos virales presentes en la partícula viral por parte de los linfocitos B para producir anticuerpos específicos. Además, es esencial el reconocimiento de epítomos T tras el procesamiento antigénico y presentación en el contexto del MHC clase II. En este sentido, la identificación y caracterización de epítomos T en la secuencia de FMDV (Bittle *et al.*, 1982; Blanco *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2000; Domingo, 1990; van Lierop *et al.*, 1995) ha sido muy importante para entender la repuesta inmune celular mediada por linfocitos T y su vía de presentación antigénica (Collen *et al.*, 1991; Garcia-Briones *et al.*, 2000; Glass *et al.*, 1991; Rodriguez *et al.*, 1994). Estos resultados han sugerido que la inducción de anticuerpos mediada por células T (CD4+), asociada a presentación via MHC clase II (Collen *et al.*, 1989), no debe ser el único mecanismo implicado en la respuesta inmune protectora frente a la enfermedad, sino que la respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T (CD8+), restringida a moléculas MHC de clase I (Childerstone *et al.*, 1999; Guzman *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 1996), ha de tener un papel fundamental en la respuesta protectora (Becker, 1994; Collen, 1994).

La respuesta inmune inducida en mucosas también ha sido objeto de estudio, dada la importancia de la ruta oro-faríngea como principal vía de infección natural por FMDV (Alexandersen & Donaldson, 2002; Cubillos *et al.*, 2008; Eble *et al.*, 2007; Francis & Black, 1983; Parida *et al.*, 2006a; Parida *et al.*, 2007). La detección de anticuerpos IgA específicos en fluido oro-faríngeo, como inducción de una repuesta inmune local y sistémica, ha sido descrita en cerdos inmunizados con altas dosis de virus inactivado o con péptidos sintéticos. Esta detección se ha correlacionado recientemente con la inducción de una respuesta protectora eficiente (Cubillos *et al.*, 2008; Eble *et al.*, 2007; Parida *et al.*, 2006a). La detección de IgAs en mucosas, a partir de fluidos oro-faríngeos de bovinos infectados con FMDV, se ha considerado como un posible indicador de persistencia viral (Amadori M, 2000; Salt *et al.*, 1996). Así, su detección en mucosas se ha empleado como una herramienta útil para la identificación de animales infectados persistentemente con FMDV o infectados asintomáticos en bovinos (Parida *et al.*, 2006a).

Por otro lado, se sabe que las citoquinas, especialmente IFN, ejercen importantes funciones en el sistema inmune para controlar la enfermedad y su estimulación es característica de una respuesta antiviral mediada por células T CD4+ (Th<sub>1</sub>) (Boehm *et al.*, 1997). Las células T dobles positivas (CD4+ CD8+) se han descrito como las

principales responsables de la producción de IFN- $\gamma$ , cuando se estimulan químicamente células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas a partir de cerdos sanos (Rodríguez-Carreno *et al.*, 2002) y cerdos vacunados con FMDV (Barnard *et al.*, 2005; Eble *et al.*, 2006). La eficiente actividad antiviral del IFN- $\gamma$  frente a FMDV, tanto *in vitro* como *in vivo*, ha sido ampliamente documentada (Moraes *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2002). Por otro lado, en animales vacunados (vacas) se ha podido establecer una correlación entre protección y el nivel de IFN- $\gamma$  detectado en el sobrenadante de ensayos de estimulación de PBMC *in vitro* (Parida *et al.*, 2006b). Esta correlación ha permitido predecir el nivel de protección frente a virus infeccioso.





## **OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Análisis estructural y funcional de la región 3' no codificante de FMDV.**

Estudio de la esencialidad e implicación en regulación génica de los dominios estructurales que componen la 3'NCR de FMDV mediante ensayos de interacción con elementos reguladores de la 5'NCR, proteínas celulares y experimentos de mutagénesis sobre clones infecciosos.

### **2.2. Caracterización en cultivo celular de RNAs con mutaciones en la 3'NCR.**

Análisis de la infectividad de los RNAs mutantes en la 3'NCR mediante ensayos de transfección en líneas celulares susceptibles. Estudio de la cinética de crecimiento, capacidad replicativa y estabilidad genética de los mutantes.

### **2.3. Ensayos de virulencia e inmunización con RNA de FMDV en ratón y cerdo.**

Análisis de la infectividad y capacidad inmunogénica de los RNAs derivados de clones infecciosos mutantes en la 3'NCR en el modelo de ratón y en un hospedador natural en comparación con la secuencia wt.

### **2.4. Evaluación de la viabilidad de estrategias vacunales frente a fiebre aftosa basadas en RNA.**

Análisis de la capacidad protectora frente a virus infeccioso de genotipos atenuados con mutaciones en la 3'NCR inoculados como RNA.







## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***4.1. Cultivo de líneas celulares eucarióticas***

#### ***4.1.1. Líneas celulares***

Las líneas celulares susceptibles a la infección por FMDV empleadas en los distintos ensayos fueron BHK-21 (“baby hamster kidney”, derivada de riñón de hámster) (Stocker, 1964) e IBRS-2, (“Instituto Biologico Renale Swine-2” de origen epitelial derivada de riñón de cerdo) (de Castro, 1972).

#### ***4.1.2. Medios y condiciones de cultivo***

Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco 1959) (Biowhittaker), suplementado con 2 mM de L-Glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) y 5% ó 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowhittaker) para BHK-21 ó IBRS-2, respectivamente. Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### ***4.2. Aislados virales de FMDV***

- **C-S8c1.** Clon biológico del aislado natural FMDV C<sub>1</sub> Santa Pau/Spain/70 (Santa Pau, Gerona, 1970) obtenido tras tres aislamientos en placa en BHK-21 (Sobrino *et al.*, 1983).
- **O1K.** Clon biológico del aislado natural FMDV O<sub>1</sub> Kaufbeuren/FRG/66 (Kaufbeuren, Germany, 1966) obtenido tras ser pasado inicialmente en cultivo primario de células de tiroides bovino (BTY) y posteriormente en BHK-21 (Forss *et al.*, 1984; Snowdon, 1966; Xie *et al.*, 1987).

### ***4.3. Clones infecciosos de FMDV y subclones***

Las siguientes construcciones, que incluyen copias del genoma viral en versión DNA, han sido utilizadas para la generación de mutantes y/o para la producción de RNA y virus mediante transcripción *in vitro* y transfección, respectivamente. Los plásmidos con los que se ha trabajado son los siguientes:

#### ***4.3.1. Clones infecciosos y derivados***

- **pO1K.** Clon de longitud completa correspondiente al plásmido pDM (Saiz *et al.*, 2001), basado en el clon infeccioso pSP65FMDVpolyC (Falk *et al.*, 1992; Zibert *et al.*,

1990) construido a partir del aislado O<sub>1</sub>K, en el que se generaron los sitios de restricción únicos *Stu*I y *Eco*RV, flanqueando la región 3'NCR (Saiz *et al.*, 2001).

- **pO1K Δ3'NCR**. Este plásmido deriva del clon pO1K, en el que se delecionaron 74 nt de la 3'NCR mediante digestión con *Stu*I y *Eco*RV (posiciones 9 y 86 a partir del codón “stop”, respectivamente), tratamiento con DNA polimerasa de T4 y ligación (Saiz *et al.*, 2001).

- **pO1K-ΔSL1**. Este plásmido es un derivado del clon pO1K en el que se han delecionado, mediante PCR recombinante (Kunkel, 1985), los nucleótidos 4 al 33 a partir del codón “stop”. La región delecionada abarca la estructura secundaria proximal tipo “stem-loop” (SL1) predicha en la 3'NCR de FMDV.

- **pO1K-ΔSL2**. Clon derivado de pO1K en el que se han delecionado, mediante PCR recombinante (Kunkel, 1985), los nucleótidos 50 al 83 a partir del codón “stop”. La región delecionada abarca la estructura secundaria distal tipo “stem-loop” (SL2) predicha en la 3'NCR de FMDV.

- **pO1K/C-S8c1**. Clon quimérico de longitud completa, que contiene la región comprendida entre los aminoácidos 33 de VP4 y 62 de 2B (nt 1.739 – 4.066) del aislado C-S8c1, en el clon pSP65FMDVpolyC de serotipo O (Baranowski *et al.*, 1998).

#### ***4.3.2. Subclones***

Estos plásmidos contienen secuencias de DNA correspondientes a los elementos de las 5' y 3'NCRs que se indican.

- **Fragmento S**. Las secuencias correspondientes al fragmento S (nt 1-367) del RNA de O1K y C-S8c1 (Escarmis *et al.*, 1992) fueron amplificadas mediante RT-PCR usando los cebadores Sac-S-R-C (GGAACGAGCTCTGAAAGGCGGGTTTCGGGTGAC), Sac-S-R-O (GGAACGAGCTCTGAAAGGCGGGCGTCGGGTGAC) y Sac-S-L-O/C (GGAACGAGCTCTTGAAAGGGGGCGCTAGGGTCTCAC), los cuales introducen el sitio de restricción *Sac*I. Los productos fueron digeridos con *Sac*I y clonados en ambas orientaciones en Bluescript II SK+ (Stratagene), previamente linearizado con *Sac*I y desfosforilado.

- **IRES**. El clon que contiene la secuencia completa del IRES de FMDV C-S8c1 (462 nt) en pGEM ha sido descrito previamente (Lopez de Quinto *et al.*, 2001; Ramos & Martinez-Salas, 1999).

- **3'NCR.** El plásmido que contiene la secuencia completa de la 3'NCR de FMDV O1K (pTAG) en Bluescript II SK+ ha sido descrito previamente (Lopez de Quinto *et al.*, 2002).
- **SL1 y SL2.** Dos plásmidos derivados del clon infeccioso pO1K (Saiz *et al.*, 2001) contienen las secuencias correspondientes a los SLs 1 y 2 del 3'NCR de FMDV O1K en Bluescript II SK+, según la predicción estructural abarcando los nt 4 a 33 y 55 a 82 a partir del codón “stop”, respectivamente.
- **3'NCR-SVDV.** Un plásmido que contiene el 3'NCR de SVDV se obtuvo por excisión del fragmento *AvrII-HpaI* de la construcción pCHIM (Saiz *et al.*, 2001) y clonación en Bluescript SK +.

#### ***4.4. Preparación de extractos celulares***

Los extractos celulares S10 se obtuvieron y procesaron como se describe en (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000). Brevemente, monocapas de células BHK-21 sembradas en 10 placas de 10 cm de diámetro (p100, Nunc) y crecidas en DMEM al 5% de FBS, se lavaron con PBS a 4°C y se recogieron para una primera centrifugación a 4°C durante 5 min a 2.000g. Las células fueron resuspendidas en 1-2 volúmenes de tampón hipotónico (10 mM HEPES, pH 7,4; 10 mM KAc; 1,5 mM MgAc; 2,5 mM DTT) y lisadas manualmente con un “glass Douncer”. A continuación, los extractos S10 fueron obtenidos tras una centrifugación a 4°C durante 5 min a 5.000g, seguido de otra centrifugación durante 5 min a 10.000g y ajustando el sobrenadante al 3% de glicerol.

Cuando fue necesario, las monocapas confluentes de BHK-21 se infectaron con FMDV (C-S8, O1K) a una MOI de 5 o se transfectaron con pLb, (plásmido que expresa la proteasa Lb de FMDV) (Lopez de Quinto *et al.*, 2002), respectivamente. Estas se recogieron con tampón hipotónico a distintos tiempos post-infección para procesar y obtener el correspondiente extracto celular S10. La concentración de proteínas en los extractos S10 se determinó mediante el método de Bradford.

#### ***4.5. Ensayos de interacción RNA-RNA***

Los ensayos de interacción RNA-RNA se realizaron empleando transcritos marcados con [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-CTP incubados de forma independiente durante 3 min a 95°C, enfriados en hielo y mezclados con transcritos de RNA (no marcados radiactivamente) en 50 nM de cacodilato sódico pH 7,5, 300 mM de KCl y 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. La mezcla

de transcritos fue incubada durante 30 min a 37°C y analizada por electroforesis en geles nativos de acrilamida suplementados con 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> a 4°C durante 33 min a 180 V en tampón TBM (45 mM de Tris pH 8,3, 43 mM de ácido bórico y 0,1 mM de MgCl<sub>2</sub>). En algunos ensayos, una sonda de poli(A) y tRNA sin marcar fueron utilizados como controles, respectivamente.

En todos los casos, los geles fueron secados para detectar bandas de retardo electroforético por autoradiografía.

### ***4.6. Ensayos de interacción RNA-proteínas***

Las interacciones entre RNA y proteínas se analizaron mediante ensayos de “UV-crosslinking” como se describe en (Lopez de Quinto *et al.*, 2001). En estos ensayos se emplearon 20-40 µg de proteínas (en extractos S10) y 0,03 pmol del correspondiente transcrito de RNA específico marcado radiactivamente con [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-CTP. Las reacciones fueron incubadas durante 18 min a temperatura ambiente y expuestas a luz UV (254 nm, Stratalinker 1800, Stratagene) durante 30 min en hielo a una distancia de 10 cm. A continuación, la mezcla se incubó con RNasa A (en exceso) durante 30 min a 37°C, se añadió tampón de carga-SDS y se calentó durante 2 min a 95°C. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS de entre 4 y 10 %, que posteriormente fueron secados y expuestos para la detección de las proteínas marcadas con [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-CTP por autoradiografía.

La inmunodetección de proteínas se realizó mediante WB. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas PVDF (BioRad), seguido de una incubación con sueros policlonales anti-PABP (cedido por A. Nieto) (Burgui *et al.*, 2003), eIF3 (Meyer *et al.*, 1982) o anti-PCBP1-2, (cedido por R. Andino) y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y posterior revelado usando el substrato ECL (SuperSignal west-Dura, Pierce). La inmunoprecipitación de PABP se realizó como se describe en (Lopez de Quinto *et al.*, 2001), empleando un suero policlonal anti-PABP.

### ***4.7. Infecciones de monocapas celulares***

#### ***4.7.1. Infecciones en medio líquido***

Las infecciones en medio líquido se realizaron como se describe en (Domingo *et al.*, 1980; Sobrino *et al.*, 1983). Células BHK-21 ó IBRS-2, sembradas 24 h antes, se infectaron a una MOI de 0,1-5. Tras la hora de adsorción a 37°C en una atmósfera con

un 5% de CO<sub>2</sub> y agitación cada 15 min, se retiró el inóculo y las monocapas se incubaron entre 1-6 días post-infección, en las mismas condiciones.

Igualmente, se realizaron infecciones seriadas con sobrenadantes de cultivo y pases ciegos con sobrenadantes (obtenidos tras tres ciclos de congelación-descongelación) cuando no se pudo observar CPE. Para ello, células BHK-21 ó IBRS-2 se incubaron con 100 µl del sobrenadante correspondiente en las condiciones experimentales mencionadas con anterioridad. Los sobrenadantes virales fueron titulados como se describe en el apartado 4.7.2.

#### ***4.7.2. Plaqueos de virus en medio con agar semisólido***

Los plaqueos de virus se realizaron de igual forma que lo descrito para las infecciones en medio líquido, pero añadiendo tras la hora de adsorción medio mínimo de Eagle (EMEM 2X, Biowhittaker), agar noble (Difco) a una concentración final de 0,6% y 1-3% de FBS y se mantuvieron durante 24-48 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, las células fueron fijadas con formaldehído al 2% y teñidas con una solución de cristal violeta (2% de cristal violeta en formaldehído al 2%). Posteriormente, se realizó el recuento de placas de lisis para la titulación de los virus (PFU/ml), así como el análisis fenotípico de las placas.

#### ***4.8. Curva de crecimiento de virus***

Los sobrenadantes de infección recogidos a distintos tiempos post-infección, previamente titulados mediante plaqueo en células IBRS-2, fueron utilizados para determinar la cinética de crecimiento viral. Para ello, cada sobrenadante fue inoculado sobre células IBRS-2, a una MOI de 0,1. Tras la hora de adsorción a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el inóculo, se añadió DMEM con 5% de FBS y se incubó en las mismas condiciones. Los sobrenadantes recogidos fueron titulados como se describe en el apartado 4.7.2.

#### ***4.9. Síntesis y cuantificación de RNA***

La síntesis de RNA a partir de clones infecciosos y sus derivados se realizó mediante transcripción *in vitro* a partir del plásmido correspondiente, previa linearización con *HpaI* (New England Biolabs, Beberly, Mass.).

Los plásmidos que contienen la secuencia correspondiente a las regiones S, IRES o 3'NCR, (para los ensayos de interacción RNA-RNA y RNA-proteínas), fueron

linearizados con *XhoI* o *NotI* (New England Biolabs, Beberly, Mass.), mientras que para sintetizar el transcrito 3'NCR con la cola de poli(A) delecionada, el correspondiente plásmido fue linearizado con *EcoRV*.

Las transcripciones se realizaron durante 1 h a 37°C empleando las RNA polimerasas de SP6, T7 o T3 (Promega, Madison, Wis), según el plásmido. Los productos de transcripción se trataron con RQ1 DNasa (1 U/μg RNA, Promega), fueron extraídos con fenol-cloroformo (Sigma) y precipitados con etanol. La integridad y cuantificación de los transcritos se determinaron mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Cuando fue necesario, los transcritos de RNA fueron marcados con [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-CTP (400 Ci/mmol). El [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-CTP no incorporado fue eliminado por cromatografía de exclusión empleando columnas de Sephadex (MicroSpin G-50). La integridad de estos transcritos se analizó en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (urea 7 M).

### ***4.10. Transfecciones***

Para las transfecciones se emplearon monocapas subconfluentes (aproximadamente un 80%) de células BHK-21 ó IBRS-2 sembradas el día anterior. Se transfectaron entre 1 y 7,5 x 10<sup>6</sup> células (según la línea celular) con entre 50 ng y 10 μg de los transcritos derivados de clones infecciosos utilizando Lipofectina (Invitrogen) (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 1997). Brevemente, la mezcla de Lipofectina y RNA se mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente y a continuación se añadió a la monocapa, incubando durante 6-7 h a 37°C, con agitación en cruz cada 15 min durante las dos primeras horas. Pasado este tiempo, las células fueron mantenidas durante 24-72 h en medio líquido o en medio con agar como se describe en apartados anteriores.

### ***4.11. Extracción de RNA viral***

#### ***4.11.1. Extracción a partir de monocapas transfectadas***

Aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células BHK-21 o IBRS-2 fueron lisadas con 260 μl de tampón de lisis (0,5% NP-40, 120 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl, pH 7,8) a distintos tiempos post-transfección (p.t.), previa retirada del sobrenadante y lavado de la monocapa con PBS. El lisado recogido se clarificó por centrifugación a 16.100g durante 5 min a 4°C. El RNA citoplásmico total se extrajo con TRI-Reagent (Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante, precipitando con isopropanol y 1 μg de tRNA como

“carrier”, lavando con etanol al 70% y finalmente resuspendiendo en 20 µl de agua tratada con DEPC.

#### ***4.11.2. Extracción a partir de sobrenadantes de células transfectadas o infectadas***

La extracción se realizó partiendo de un volumen de sobrenadante de 0,2 ml en 1 ml de TRI-Reagent (Sigma). El RNA se recuperó precipitando y lavando como en el apartado anterior. Finalmente, el RNA se resuspendió en 20 µl de agua DEPC.

#### ***4.12. Secuenciación de genomas virales***

La secuencia de los virus presentes en sobrenadantes de células transfectadas con transcritos de FMDV, infectadas con virus, o recuperados de tejidos animales, se determinó mediante secuenciación automática de fragmentos solapantes de cDNA amplificados mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos cebadores específicos según la región a secuenciar.

##### ***4.12.1. Amplificación por RT-PCR***

El genoma viral completo se amplificó mediante 6 fragmentos solapantes según el esquema de la Figura 2. La secuencia, posición y orientación de los oligonucleótidos utilizados se detalla en la Tabla 1. Para la reacción de transcripción inversa (RT) se utilizaron 2 µl de RNA extraído de sobrenadante de transfección como se ha descrito en el apartado 4.11. La RT consistió en una desnaturalización del RNA durante 10 min a 70°C y posterior incubación durante 50 min a 50°C con 1 µl de oligonucleótido (20 µM), 1 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de RNasin (40 U/µL) (Promega), 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl de 5X *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl de *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (200 U/µl) (Invitrogen) y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 20 µl. A continuación, la reacción se incubó con 1 µl de RNasa H (1 U/µl) (Roche) durante 20 min a 37°C.

La amplificación por PCR se realizó usando 5 µl del producto de RT, el oligonucleótido “antisense” correspondiente y el kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche), según las instrucciones del fabricante. Los ciclos para la PCR fueron los siguientes: una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C seguida de 30 ciclos (94°C durante 45 s; 55°C durante 45 s; 72°C durante 2 min) y una incubación final a 72°C durante 7 min. Las reacciones de PCR se analizaron en geles de agarosa.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación del genoma completo de FMDV

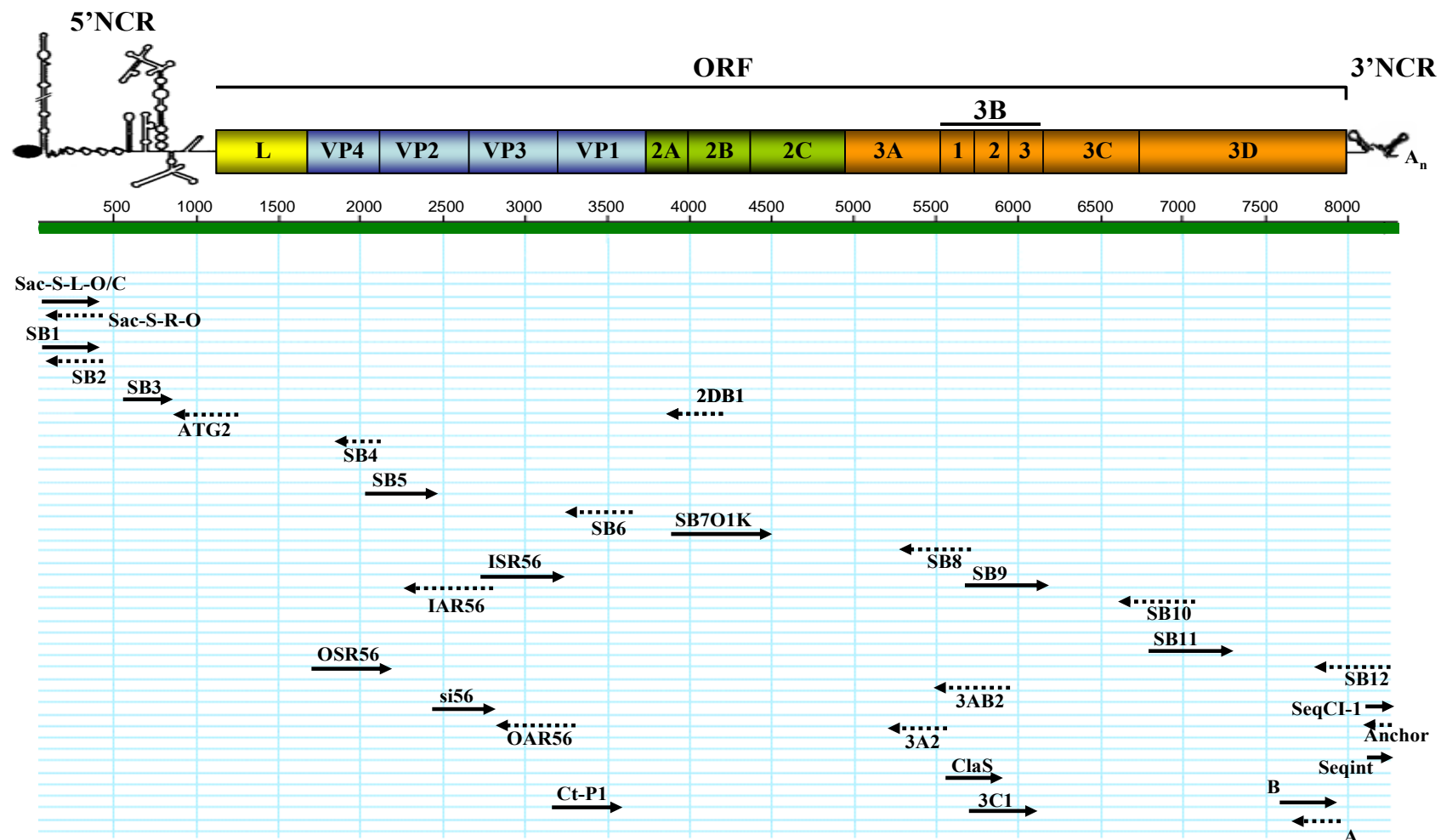
Región	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Orientación <sup>a</sup>	Posición
5'NCR	Sac-S-L-O/C	GGAACGAGCTCTTGAAAGGGGGCGCTAGGGTCTCAC	S	1 <sup>b</sup>
	SB1	TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTCTCAC	S	1 <sup>b</sup>
	SB2	TGAAAGGCGGGTTTCGGGTGAC	A	346 <sup>b</sup>
	Sac-S-R-O	GGAACGAGCTCTGAAAGGCGGGCGTCGGGTGAC	A	368 <sup>b</sup>
	SB3	TAAGTTTACCGTCTGTCCCGAC	S	1 <sup>c</sup>
	ATG2	CAGTTCATTTTCCCTGTGGTGCG	A	806 <sup>c</sup>
P1	SB5	ACCTCTACACACACAACCAACACCC	S	1.476 <sup>c</sup>
	SB4	GTTGCATACCCGAATGTGACTCC	A	1.677 <sup>c</sup>
	si56	ATCACAGTGCCCTTTGTTGG	S	2.043 <sup>c</sup>
	Ct-P1	GACTTTGAGCTAAGGCTGCCGGTGG	S	2.847 <sup>c</sup>
P2	SB7O1K	CATACTGTCCAAGGCCCTTGCTGGC	S	3.437 <sup>c</sup>
	SB6	CTCCACATCTCCAGCCAATTGAGCA	A	3.559 <sup>c</sup>
	2BD1	CAAACGTGCTGTCCAGAATCTC	A	3.868 <sup>c</sup>
P3	SB9	ATGACCAGACACTTGACGAGGCGG	S	5.291 <sup>c</sup>
	SB8	GGCGTAGGGTCCTTCAGCTTGCGG	A	5.458 <sup>c</sup>
	Cla S	TATAATCGATGGACCTTACGCCGGTCCGA	S	5.508 <sup>c</sup>
	3-AB2	TAGGTACCTTATTCCTTGACGACCGGGG	A	5.599 <sup>c</sup>
	SB11	CTCAAAATGAAGGCACACATCGACC	S	6.259 <sup>c</sup>
	3-A2	TAGGTACCCCATGGTCTAGATTACTTGTGCGGGAG	A	6.297 <sup>c</sup>
	3C1	TATAAAGCTTATGAGTGGTGGCCCCCGAC	S	6.297 <sup>c</sup>
	SB10	GGCAGTACTTTCTCCATCGGGCG	A	6.822 <sup>c</sup>
3'NCR	SEQCI-1	CTCTTTGAGCCTTTCCAAGG	S	7.623 <sup>c</sup>
	SEQINT	CCAAGGTCTCTTTGAGATTCC	S	7.637 <sup>c</sup>
	SB12	TTTTTTTTTTGGATTAAGGAAGCGGGAA	A	8.151 <sup>c</sup>
	ANCHOR	TTTTTTTTTTTTTTTGG	A	8.151 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Orientación de la secuencia del oligonucleótido. “A” significa “antisentido” (secuencia complementaria a la secuencia genómica de FMDV) y “S” significa “sentido” (secuencia con la misma polaridad que el genoma de FMDV).

<sup>b</sup>Posición referida a la secuencia EMBL APHOC5S con número de acceso D10138 (GenBank).

<sup>c</sup>Posición referida a la secuencia EMBL PIFMDV2 con número de acceso X00871 (GenBank).





**Figura 2.** Representación esquemática del anillamiento de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del genoma de FMDV. Las posiciones de los oligonucleótidos están referidas a las secuencias registradas en GenBank: EMBL APHOC5S (número de acceso D10138) y EMBL PIFMDV2 (numero de acceso X00781).

#### **4.12.2. Secuenciación**

Previamente a la secuenciación, los oligonucleótidos y dNTPs no incorporados de la reacción de PCR se eliminaron por filtración usando el kit *Montage<sup>TM</sup> PCR Centrifugal Filter Devices* (Millipore), según las instrucciones del fabricante.

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó en un secuenciador automático ABI373 (Applied Biosystems) usando cebadores específicos (Tabla 1 y Figura 2) y los kits *BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit*. La secuencia se analizó con los programas *Chromas 2.3* (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y *DNA Star 5.01* (Lagergene).

#### **4.13. Cuantificación de moléculas de RNA viral de polaridad positiva y negativa**

El número de copias de genoma viral de polaridad (+) y (-) se determinó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con los oligonucleótidos A y B, diseñados para amplificar una región conservada de 290 nt en el gen de la polimerasa viral 3D (Saiz *et al.*, 2003) (Figura 1, Tabla 2). El RNA citoplásmico extraído de células transfectadas (apartado 4.10) se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Cantidades equivalentes de cada RNA a analizar (50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng, 500 ng y 1 µg) se utilizaron para una reacción de RT durante 30 min a 55°C con el kit *Transcriptor RT* (Roche) y los oligonucleótidos A ó tag-B (100 ng/µl) (Tabla 2), para obtener un cDNA de cadena positiva o negativa, respectivamente. La secuencia heteróloga “tag” corresponde a las posiciones 3.663–3.681 del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), que fue añadida al extremo 5' del oligonucleótido B, como se describe en (Herrera *et al.*, 2008).

Seguidamente se realizó una reacción de PCR cuantitativa a tiempo real, en el equipo “LightCycler” (Roche) utilizando el kit *LightCycler® FastStart DNA Master SYBER Green I* (Roche), según las recomendaciones del fabricante. Para amplificar la cadena positiva se usaron 0,5 µl de la pareja de oligonucleótidos A y B (a 10 ng/µl cada uno) y para la negativa 0,5 µl de oligonucleótidos A y tag (a 10 ng/µl cada uno) en un volumen final de 10 µl. El programa de PCR utilizado fue: 95°C durante 600 s y 55 ciclos de amplificación (95°C durante 10 s; 55°C durante 5 s; 72°C durante 5 s), un paso final de “melting” a 65°C durante 15 s y desnaturalización a 95°C.

La cuantificación del RNA se realizó extrapolando los valores de fluorescencia emitida durante la amplificación sobre una curva estándar realizada en paralelo con diluciones seriadas de un transcrito de RNA de polaridad positiva (derivado del clon pO1K) o de polaridad negativa (transcrito de RNA (-) de la región 3D derivado del plásmido pMT28, que contiene el genoma completo de C-S8c1 (Herrera *et al.*, 2008). Las diluciones de los transcritos de RNA empleadas en las curvas estándar se encuentran en el rango:  $2,4 \times 10^6$  -  $2,4 \times 10^{11}$  moléculas/ $\mu$ l (para la cadena positiva) y  $2,2 \times 10^3$  -  $2,2 \times 10^7$  moléculas/ $\mu$ l (para la cadena negativa).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>
A	CACACGGCGTTCACCCA(A/T)CGC	A	7.678
B	GACAAAGGTTTGTTCCTGGTC	S	7.400
tag-B	tag-GACAAAGGTTTGTTCCTGGTC	S	7.400
tag	AGTTTAAGAACCCTTCCCGC		-

<sup>a</sup>Orientación de la secuencia del oligonucleótido. “A” significa antisentido (secuencia complementaria a la secuencia genómica de FMDV) y “S” significa sentido (secuencia con la misma polaridad que el genoma de de FMDV).

<sup>b</sup>Posición referida a la secuencia EMBL PIFMDV2 con número de acceso X00781 (GenBank).

Mediante ensayos dirigidos a determinar la especificidad de amplificación de las cadenas (+) y (-) respectivamente, en presencia de altas concentraciones de RNA de polaridad contraria, se comprobó que la amplificación era específica de cadena para muestras que contienen cantidades iguales o inferiores a  $2,4 \times 10^8$  moléculas de RNA.

#### **4.14. Mutagénesis dirigida mediante PCR sobre un clon infeccioso de FMDV**

La mutación de la posición 56 en la proteína VP3 de arginina a histidina se realizó sobre el clon pO1K y sus derivados pO1K - $\Delta$ SL1, - $\Delta$ SL2 y - $\Delta$ 3’NCR mediante mutagénesis dirigida basada en PCR recombinante (Kunkel, 1985).

La PCR recombinante se realizó en dos pasos, empleando una mezcla de las polimerasas de DNA termoestables Taq y Pfu (Roche) en la proporción 6-9:1, junto con la pareja de oligonucleótidos (ISR56 e IAR56), diseñados para introducir la mutación puntual R56→H en VP3. En el primer paso se generaron las reacciones parciales de

PCR (izquierda y derecha), empleando las parejas de oligonucleótidos OSR56/IAR56 e ISR56/OAR56 sobre el clon pO1K, respectivamente (Figura 2). Las condiciones de amplificación de las reacciones parciales fueron 30 ciclos de 94°C durante 45 s; 60°C durante 1 min para la reacción parcial izquierda, y 94°C durante 45 s; 60°C durante 45 s para la reacción parcial derecha. Antes de iniciar la PCR se realizó una desnaturalización (94°C durante 5 min) y a continuación se añadió la mezcla de polimerasas.

El segundo paso consistió en generar el producto de extensión de PCR mediante tres ciclos de PCR (94°C durante 1 min; 50°C durante 1,5 min; 72°C durante 1,5 min) a partir de la mezcla de los productos parciales generados en la primera amplificación en ausencia de oligonucleótidos externos por extensión de los heterodúplex formados. Después se añadieron los oligonucleótidos externos (OSR56 y OAR56) y se realizaron 30 ciclos de PCR en las mismas condiciones.

**Tabla 3.** Secuencia de oligonucleótidos empleados en la mutagénesis VP3-56 R→H

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>
OSR56	GTGTTTGCGTGTGTACCTCCAACGGG	S	1.161
IAR56	CGCCACCCTCGAAG <u>TGC</u> AGAAACGTCGGG	A	2.285
OAR56	GCGTCGCCGTCGGCCTTGCCATGTG	A	2.794
ISR56	CCCGACGTTTCTG <u>CAC</u> TTCGAGGGTGGCG	S	2.285

Se han destacado en negrita los residuos que introducen la mutación dentro del codón correspondiente (subrayado).

<sup>a</sup>Orientación de la secuencia del oligonucleótido. A significa “antisentido” (secuencia complementaria a la secuencia genómica de FMDV) y “S” significa “sentido” (secuencia con la misma polaridad que el genoma de FMDV).

<sup>b</sup>Posición referida a la secuencia EMBL PIFMDV2 con número de acceso X00871 (GenBank).

Los productos de amplificación se digirieron con *Bsi*WI, se purificaron de geles de agarosa de bajo punto de fusión (SERVA) usando el kit *Agarose Gel DNA Extraction Kit* (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Finalmente, el fragmento *Bsi*WI de 1.152 pb se clonó en el sitio *Bsi*WI del clon pO1K y sus derivados (-ΔSL1, -ΔSL2 y -Δ3'NCR), previa escisión del fragmento *Bsi*WI correspondiente en cada plásmido (nt 1.266 y 2.418, según FMDV EMBL con número de acceso X00871). Esto permitió obtener todas las construcciones con histidina en la posición 56 de la proteína VP3.

#### ***4.15. Experimentación animal en ratón***

Se utilizaron, en todos los casos, animales de la cepa *Swiss*, que fueron mantenidos en un box seguridad biológica de nivel 3 (BSL-3).

##### ***4.15.1. Titulación de virus en ratón lactante***

La titulación *in vivo* de sobrenadantes virales obtenidos en cultivo celular se realizó inoculando intraperitonealmente camadas de al menos 10 ratones lactantes de 7-9 días de edad, con diluciones seriadas del sobrenadante. El título se expresó como la dosis letal de virus que causa la muerte al 50% de los animales inoculados (DL<sub>50</sub>/ml) (Muench, 1935).

##### ***4.15.2. Ensayos de virulencia en ratón lactante con transcritos de FMDV***

Para ensayar la virulencia de transcritos de RNA de FMDV se emplearon igualmente ratones lactantes de 7-9 días de edad. Estos animales fueron inoculados intraperitonealmente con distintas cantidades de transcritos de RNA (desde 100 ng hasta 400 µg) resuspendidos en PBS y mezclados con 20 µg de Lipofectina (Invitrogen). En todos los casos el volumen final de inóculo fue de 100 µl (Baranowski *et al.*, 2003).

Para confirmar la infectividad de los transcritos de RNA inoculados en ratón lactante, como resultado de la replicación y producción de virus infeccioso a partir de la inoculación, se realizó un ensayo de transmisión de virulencia. Para ello, ratones lactantes fueron inoculados intraperitonealmente con 100 µl de diluciones 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> de homogenado tisular (0,3-0,5 g de tejido cerebral y muscular de las extremidades posteriores en 0,6 ml de PBS), previa clarificación del extracto por centrifugación 2 min a 400g y filtrado por membrana de 0,45 µm de diámetro (Baranowski *et al.*, 2003).

##### ***4.15.3. Inoculación de ratón adulto con transcritos de FMDV***

Para estudiar la capacidad inmunogénica del RNA de FMDV en ratón adulto, ratones de 8-10 semanas de edad fueron inoculados en el músculo tibial anterior con dosis de 10 µg, 50 µg y 100 µg de transcritos de RNA derivados de clones infecciosos resuspendidos en PBS y en un volumen final de inóculo de 50 µl.

#### ***4.15.4. Desafío con FMDV de los ratones adultos inoculados con RNA***

Para valorar la capacidad protectora de la inoculación con transcritos de FMDV, a los 3 meses post-inmunización fueron desafiados intradérmicamente (almohadilla plantar de una de las extremidades posteriores) con  $10^3$  PFU de virus, en un volumen final de inóculo de 50  $\mu$ l. Paralelamente, animales no inmunizados fueron inoculados (en las mismas condiciones) con  $10^3$  PFU del virus o PBS, como controles del desafío y negativo, respectivamente.

#### ***4.15.5. Recogida y procesamiento de muestras de ratón adulto***

Con objeto de analizar la generación de virus infeccioso a partir de la inoculación con RNA y su capacidad de inducir anticuerpos específicos en ratón adulto, se recogieron y procesaron muestras de sangre extraída de la cola (sin anticoagulantes) a distintos días post-inoculación (p.i.) y p.d. A partir de estas muestras se extrajo suero, incubando previamente la muestra de sangre durante 30-60 min a 37°C y 12 h a 4°C y clarificación posterior por centrifugación a 2.300g durante 10 min a 4°C. Las muestras de suero destinadas a la detección de anticuerpos específicos fueron descomplementadas por calentamiento a 56°C durante 30 min.

#### ***4.16. Experimentación animal en cerdo***

Los animales empleados en los ensayos fueron hembras híbridas White Large x Landrace de aproximadamente 20-25 Kg de peso y alrededor de tres meses de edad. Durante el transcurso de los experimentos, los animales se mantuvieron en boxes BSL-3.

##### ***4.16.1. Ensayos de virulencia en cerdo con transcritos de FMDV***

Con el fin de ensayar la virulencia del RNA de FMDV en el hospedador natural, tres cerdos fueron inoculados intradérmicamente (rodete coronario de una de las extremidades) con 150  $\mu$ g, 300  $\mu$ g ó 500  $\mu$ g de RNA O1K/C-S8, (transcrito derivado del clon pO1K/C-S8c1), resuspendido en PBS y 40  $\mu$ g de Lipofectina (Invitrogen) en un volumen final de inóculo de 0,2 ml. Simultáneamente, un animal contacto sin inocular se mantuvo en el mismo box durante el experimento.

Todos los animales fueron examinados diariamente para analizar los síntomas clínicos de la enfermedad y para tomar muestras de sangre e hisopos a diferentes tiempos p.i.

#### ***4.16.2. Inmunización de cerdos con transcritos de FMDV***

Para estudiar la capacidad inmunogénica del RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>), dos grupos de cuatro animales (mantenidos en boxes distintos) fueron inoculados con 500 µg de RNA resuspendido en PBS y 40 µg de Lipofectina, como se describe en el apartado anterior. Uno de los grupos, el día 24 p.i., fue inoculado con una segunda dosis de 500 µg de RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>).

Igualmente, también se realizó a diario el seguimiento de la aparición de signos clínicos de la enfermedad, registro de la temperatura rectal de todos los animales y se tomaron muestras de sangre e hisopos a distintos tiempos p.i.

#### ***4.16.3. Desafío con FMDV de los cerdos inoculados con RNA***

Con objeto de valorar la protección en cerdo mediada por la inoculación de RNA, 45 días después de la primera inoculación (y 21 de la segunda), los animales inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>), junto con otros dos (uno en cada grupo), incorporados como controles de desafío, fueron inoculados en rodete coronario con 10<sup>4</sup> PFU de virus O1K (VP3-H<sub>56</sub>) en un volumen de 0,1 ml. El virus de desafío se obtuvo a partir del sobrenadante de transfección con RNA derivado del clon infeccioso pO1K (VP3-H<sub>56</sub>) y un pase en cultivo celular, ambos en la línea celular BHK-21. El título del virus de desafío, determinado en ratón lactante, fue de 4 x 10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub>/ml.

#### ***4.16.4. Recogida y procesamiento de muestras de cerdo***

Para la detección de virus y anticuerpos específicos en los animales inoculados con RNA O1K/C-S8c1, se recogieron muestras de sangre, nódulos linfáticos y epitelio y líquido vesiculares a distintos días p.i.

Igualmente, para detectar virus y analizar la respuesta inmune humoral y celular en los animales inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>), se tomaron muestras de sangre, suero e hisopos a distintos días a lo largo de los 59 días del experimento.

El procesamiento de las muestras de ambos experimentos se realizó como se detalla a continuación:

1. Sangre. Las muestras se recogieron en EDTA 5 mM para evitar la coagulación.
2. Suero. Las muestras de suero se obtuvieron a partir de las muestras de sangre y se trataron de igual forma que las muestras de suero de ratón (apartado 4.15.5).
3. Hisopos nasales. Obtenidos por introducción de hisopos de algodón estéril a través de las fosas nasales y solubilización durante 30 min a 4°C en 0,5 ml de PBS suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco).
4. Nódulos linfáticos. Estas muestras, obtenidas en la necropsia, fueron homogenizadas en PBS y clarificadas por centrifugación.
5. Epitelio y líquido vesiculares extraídos de aftas. Las muestras de epitelio vesicular se trataron como los hisopos nasales. El líquido vesicular se congeló directamente a -70°C.

### ***4.17. Detección de RNA viral en muestras animales***

La detección de RNA viral se realizó mediante RT-PCR en una única reacción, empleando los oligonucleótidos A y B diseñados para amplificar una región conservada del gen de la polimerasa viral 3D, según el protocolo descrito en (Saiz *et al.*, 2003), (Figura 2). El límite de detección de la reacción de RT-PCR para aislados de serotipo O es de 10<sup>-2</sup> PFU.

La amplificación se realizó a partir del RNA extraído de muestras de suero (100 µl) e hisopos nasales (100 µl), procesadas como se describe en el apartado 4.16.4. La extracción del RNA de las muestras se realizó con TRI-Reagent (Sigma), siguiendo las recomendaciones del fabricante (apartado 4.11.1). El ensayo se realizó con 1 µl de RNA (extraído de las muestras de suero e hisopos (diluciones 1:1, 1:10 y 1:100), 2,5 µl de PCR buffer II (10X), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 5 U de RNase Inhibitor (Perkin-Elmer), 12,5 U de transcriptasa inversa MuMLV (Perkin-Elmer), 0,625 U de AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer), 5-10 pmol de cada oligonucleótido y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de reacción de 25 µl. La reacción de RT-PCR se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research) con el siguiente programa: 30



min a 48°C y 10 min a 95°C (para la RT) y 35 ciclos de PCR (30 s a 94°C; 45 s a 55°C; 45 s a 72°C) y 7 min a 72°C. El producto de RT-PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

#### ***4.18. Cuantificación de genomas virales en suero***

Un volumen de 200 µl de suero extraído de cerdos inoculados con transcritos de FMDV y/o con virus infeccioso se utilizó para extraer RNA, finalmente resuspendido en 20 µl de agua tratada con DEPC. Un volumen de 7 µl de RNA fue utilizado para la reacción de RT-PCR en tiempo real con los cebadores A y B para la cuantificación de genomas virales de polaridad positiva presentes por ml de suero analizado. La metodología seguida se ha descrito en el apartado 4.13.

#### ***4.19. Secuenciación de virus a partir de muestras de suero***

A partir de las muestras de suero extraídas de cerdos inoculados con transcritos de RNA, la secuencia de la 3'NCR, parte de la región VP3 y las regiones correspondientes a las proteínas 2C y 3C del genoma de FMDV fueron amplificadas por RT-PCR tipo “nested”.

Por un lado, la estabilidad de la delección del SL1 en el extremo 3'NCR en los virus circulantes en suero de los cerdos inoculados se analizó secuenciando esta región. Inicialmente se realizó una reacción de RT con el oligonucleótido ANCHOR, seguida de dos ciclos de amplificación de PCR, con las parejas de oligonucleótidos: SeqCI-1 y ANCHOR (para la primera) y SEQINT y SB12 (para la segunda).

Por otro, la presencia de histidina en la posición 56 de VP3 también fue comprobada. Esto se realizó usando el oligonucleótido SB6 para la reacción de RT y las parejas de oligonucleótidos: SB5/SB6 y si56/OAR56, para el primer y segundo ciclo de amplificación de PCR, respectivamente.

Los aminoácidos presentes en las posiciones 90 de 2C y 63 de 3C también fueron determinados. Para la amplificación del fragmento de 2C se empleó el oligonucleótido 3-A2 en la reacción de RT y las parejas: Ct-P1/3-A2 y SB701K/SB8, para el primer y segundo ciclo de amplificación de PCR, respectivamente. En cuanto a la región correspondiente a 3C, se empleó el oligonucleótido A para la reacción de RT y las parejas SB9/A y ClaS/SB10, para la primera y segunda amplificación de PCR,

respectivamente. La amplificación de estas regiones se realizó como se detalla en el apartado 4.12.1.

Todos los oligonucleótidos empleados figuran en las Tablas 1, 2 y Figura 2, y fueron usados a una concentración de 20  $\mu$ M. Los fragmentos amplificados se secuenciaron como se describe en el apartado 4.12.2.

#### ***4.20. Ensayos de aislamiento viral en células IBRS-2***

Los ensayos de aislamiento de virus a partir de muestras de cerdo o ratón se realizaron sobre monocapas de células IBRS-2, sembradas en placas de 24 pocillos. Estas células fueron incubadas con 0,5 ml de muestra de sangre, suero e hisopos nasales ó 50  $\mu$ l líquido vesicular, como se describe en (Ferris *et al.*, 2006), con algunas modificaciones. Brevemente, el inóculo se incubó 30-60 min a 37°C y posteriormente se añadió 1-2 ml de DMEM con 5% FBS y se incubó a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El seguimiento de la aparición de CPE se realizó durante 72 h.

A partir de los cultivos en los que no se observó CPE, se realizaron tres pases ciegos en células IBRS-2 (previa lisis de la monocapa celular mediante tres ciclos de congelación-descongelación) y se inocularon 100  $\mu$ l del sobrenadante del lisado recogido previamente, en las mismas condiciones. Las muestras se consideraron negativas cuando no se observó CPE en cultivo después de tres pases ciegos. En las muestras que fueron positivas, la especificidad del CPE fue confirmada por RT-PCR como se detalla en el apartado 4.17 y por ELISA empleando el anticuerpo monoclonal SD6 dirigido frente a la proteína viral VP1 de aislados de tipo C (Mateu *et al.*, 1987).

El título de aislamiento viral en sueros de ratones se expresó como el recíproco de la dilución de suero ( $\log_{10}$ ) en la que se observó CPE en el 50% de los pocillos (TCID<sub>50</sub>).

#### ***4.21. Detección de anticuerpos específicos frente a proteínas estructurales de FMDV mediante ELISA***

Se realizó a partir de muestras de sueros descomplementados por calentamiento (ver apartado 4.15.5). Este ensayo está basado en la captura de virus sin purificar, O1K ó C-S8c1, usando sueros policlonales de conejo producidos frente a los aislados C1-Noville y O1-Manisa (IAH, Pirbright, UK), que reconocen específicamente aislados de

serotipo C y O, respectivamente. En el ensayo, estos sueros policlonales se diluyeron en tampón carbonato/bicarbonato (0,05 M) pH 9,6. Los sueros descomplementados se ensayaron en microplacas de 96 pocillos (Nunc) en diluciones logarítmicas seriadas en base 3 (desde 1:50 hasta 1:1.350) diluidos en una solución de PBS-Tween 20 (0,05%). Como anticuerpo secundario se empleó un monoclonal anti-ratón IgG (H+L) (BioRad) o un suero policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas porcinas (DAKO) que reconoce fundamentalmente IgG, ambos conjugados con peroxidasa. Los anticuerpos secundarios se diluyeron en una solución de PBS-Tween 20 (0,05 M) suplementado con 10% de SBF y 2% de suero de conejo. Como cromógenos se utilizaron OPD (Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/ml o TMB (“T<sub>e</sub>S<sup>c</sup>E detection kit” de Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción enzimática se paró usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3N) y la DO se determinó a 492 nm (cuando se usó como cromógeno OPD) ó 450 nm (cuando se usó TMB). El tiempo de incubación a 37°C en cada uno de los pasos fue de 1 h con agitación constante.

Paralelamente, triplicados de los correspondientes sueros de día 0 (sueros pre-inmunes) fueron ensayados como controles negativos. El título de ELISA se expresó como el recíproco de la última dilución (log<sub>10</sub>) cuyo valor de DO fue superior al doble del valor promedio de DO del los sueros control correspondientes.

La detección de anticuerpos específicos de isotipo A (IgA) en suero (diluciones 1:50, 1:100 y 1:200) se realizó empleando un anticuerpo monoclonal comercial, específico anti-IgA porcina (Serotec, UK, Cat No.MCA638). El título de IgAs se expresó como la proporción entre los valores de DO<sub>450/492</sub>, (según el cromógeno empleado) de cada suero a un determinado día p.i. y el correspondiente a su día 0.

#### ***4.22. Detección de anticuerpos frente a 3ABC mediante ELISA***

Los anticuerpos frente a proteínas no estructurales de FMDV se detectaron en muestras de suero descomplementadas (apartado 4.15.5) empleando un test de ELISA basado en el precursor 3ABC viral recombinante y diluido en PBS, como se describe en (Blanco *et al.*, 2002). Paralelamente, triplicados del suero de día 0 (suero pre-inmune) fueron incluidos como controles negativos. El título se expresó como el recíproco de la última dilución de suero (log<sub>10</sub>) cuyo valor de DO fue superior al doble del valor de DO del correspondiente suero control.

#### ***4.23. Detección de anticuerpos neutralizantes***

La presencia y niveles de anticuerpos específicos neutralizantes frente a FMDV en las muestras de suero se analizaron mediante ensayos de seroneutralización por reducción de placa (Mateu *et al.*, 1987).

Para ello, alrededor de 60-70 PFU de virus y diluciones logarítmicas seriadas en base 5 (desde 1:20 hasta 1:12.500) de suero en DMEM, se co-inocularon (en proporción 1:1 y volumen final de 200  $\mu$ l) sobre monocapas de células IBRS-2 sembradas en placas de 6 pocillos (Nunc), previa incubación durante 1 h a 4°C. Pasado este tiempo, se retiró el inóculo y se incubaron las monocapas en medio semisólido, en las condiciones descritas en el apartado 4.7.2. Posteriormente, las células fueron fijadas con formaldehído al 2% y teñidas con una solución de cristal violeta al 2%.

El título de anticuerpos neutralizantes en sueros de cerdo se expresó como el recíproco de la última dilución de suero ( $\log_{10}$ ) que provoca una reducción del 50% en el número de placas de lisis (PRN<sub>50</sub>). En ratón adulto, el título se expresó como el porcentaje de reducción del número de placas de lisis promedio de dos o tres ensayos independientes a la dilución 1:10 de suero.

#### ***4.24. Obtención de células mononucleares de sangre periférica***

La población de PBMC se aisló a partir de la sangre extraída de cerdos recogida en EDTA (5 mM). Aproximadamente, 20 ml de sangre fueron mezclados (en proporción 1:1) con PBS y se centrifugaron en 9 ml de solución Ficoll-Paque Plus GE Healthcare (Farmacia) a 342g durante 30 min a temperatura ambiente. Las PBMC fueron recogidas del gradiente y se resuspendieron en 15 ml de PBS-EDTA (0,05 M), para una centrifugación a 440g durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron resuspendidas en NH<sub>4</sub>Cl (0,85%) e incubadas 5-10 min a 4°C (para lisis los eritrocitos) y después, clarificadas con 15 ml de PBS-EDTA (0,05 M). Posteriormente, una centrifugación a 440g durante 10-15 min a temperatura ambiente permitió aislar las células PBMC de la sangre. Este último paso de lisis eritrocitaria y posterior clarificación se repitió de nuevo para resuspender finalmente en 4 ml de medio RPMI (Sigma) suplementado con FBS al 10%. El número total de PBMC se estimó por recuento celular usando cámaras de conteo (ISL FastRead 102), previa tinción con Trypan-blue.

#### **4.25. Ensayos de linfoproliferación**

Las linfoproliferaciones se realizaron en microplacas de 96 pocillos (Nunc) sembradas con  $2,5 \times 10^5$  PBMC por pocillo en medio RPMI con FBS al 10% descomplementado por calentamiento durante 1 h a 56°C. Las células fueron incubadas, en triplicado, durante 3 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, con dos dosis distintas de FMDV O1K ( $1,5 \times 10^5$  y  $6,2 \times 10^5$  PFU/ml), como estímulo específico, en un volumen final de 200 µl (Ganges *et al.*, 2005; Garcia-Briones *et al.*, 2004). Como controles negativo y positivo, triplicados de células se incubaron en RPMI en ausencia de virus o con 2,5 µg de ConA por pocillo (estímulo inespecífico), respectivamente. Pasados los 3 días de incubación con los estímulos, se añadieron 0,5 µCi de timidita tritiada [T-<sup>3</sup>H] y se incubó durante 18 h más en las mismas condiciones. Pasado este tiempo, las células se recogieron utilizando un equipo “cell harvester” (Tomtec) y se midió la radioactividad incorporada en las células como Δ c.p.m., usando un contador de centelleo (Mycrobeta counter, Pharmacia). La respuesta linfoproliferativa se expresó como IE, calculado como la proporción entre la media de c.p.m. de los triplicados de las células estimuladas y la media de c.p.m. de las incubadas con medio.

Para analizar qué vía de presentación antigénica está mediando las linfoproliferaciones, las PBMC se incubaron con cantidades saturantes de anticuerpos monoclonales (4B7 y 1F12), junto con estímulo específico (virus). Los anticuerpos 4B7 y 1F12 reconocen específicamente los MHCs porcinos de clase I o clase II (SLA-I y SLA-II), respectivamente (Bullido *et al.*, 1997; Bullido, 1996).

Cuando los cultivos de PBMC se emplearon para analizar la expresión de IFN-γ inducida *in vitro*, éstas se incubaron en presencia de  $4 \times 10^5$  y  $6,2 \times 10^5$  PFU/ml de O1K (VP3-H<sub>56</sub>) y se recogieron, sobrenadante y células, a las 24 h de la incubación (Barnard *et al.*, 2005; Garcia-Briones *et al.*, 2004). El sobrenadante se congeló a -20°C para analizar los niveles de IFN-γ en ensayos de ELISA. El precipitado se resuspendió en 1 ml de TRI-Reagent para extraer el RNA, como se detalla en el apartado 4.11.1, para amplificar por RT-PCR los RNAs mensajeros de IFN-γ inducidos *in vitro*. Como control negativo y positivo de las PBMC, estas se incubaron en ausencia de virus (sólo medio) y con PMA (30 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml), respectivamente.

#### ***4.26. Detección de IFN- $\gamma$ mediante ELISA***

La detección de IFN- $\gamma$  a partir de los sobrenadantes recuperados de los ensayos de linfoproliferación, se realizó mediante un ELISA basado en la captura de IFN- $\gamma$ .

Los sobrenadantes de PMBC, estimuladas previamente como se detalla en el apartado 4.25, se ensayaron en microplacas de 96 pocillos, tapizadas previamente con un anticuerpo de captura anti-IFN- $\gamma$  (A-PORCINE IFN GAMMA PURE, BD Pharmigen) diluido en tampón carbonato/bicarbonato (0,05 M) pH 9,6 hasta una concentración de 0,5  $\mu$ g/ml. Tras el tapizado, las placas fueron bloqueadas con PBS-Tween 20-BSA 1%. Para la detección de IFN- $\gamma$  en dichos sobrenadantes, se empleó un anticuerpo conjugado con biotina (PIG INF-GMA BIOTIN MAB, BD Pharmigen) diluido con el mismo tampón y concentración anterior. A continuación, se añadió peroxidasa conjugada con estreptavidina (Extravidin-HRP, Sigma), y como cromógeno se utilizó TMB (Sigma), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La DO se determinó a 450 nm.

La cuantificación de IFN- $\gamma$  se realizó por extrapolación de las lecturas de DO<sub>450</sub> de las muestras ensayadas en una curva estándar realizada con un IFN- $\gamma$  porcino recombinante comercial (Invitrogen) en el rango de 4-500 pg/ml. Los tiempos de incubación a 37°C en cada uno de los pasos fueron de 1 h con agitación.

#### ***4.27. Análisis de expresión de IFN- $\gamma$ mediante RT-PCR***

El RNA extraído de las PBMC (apartado 4.11.1), estimuladas como se detalla en el apartado 4.25, se empleó para analizar la expresión del mRNA de IFN- $\gamma$  mediante RT-PCR semicuantitativa usando los oligonucleótidos específicos: ae1918 (5'-CTTACTGCCAGGCGCCCTTTT-3') y ae1019 (5'-CTGATGGCTTTGCGCTGGATCT-3') (Garcia-Briones *et al.*, 2004; Revilla *et al.*, 2004). La amplificación se realizó como se describe en el apartado 4.17, pero aplicando 40 ciclos de amplificación. Como control cuantitativo interno de RNA, se realizó la amplificación de la proteína ciclofilina (de expresión constitutiva), usando los oligonucleótidos específicos: Cyclophilin A (5'-TGCCATCCAACCACTCAG-3') y Cyclophilin S (5'-TAACCCACCGTCTTCTT-3') (Dozois *et al.*, 1997; Gil *et al.*, 2003), en las condiciones descritas en el apartado 4.17.

#### ***4.28. Análisis estadístico***

Los datos representados en la cinética de crecimiento (apartado 4.8), cuantificación de moléculas de RNA viral (apartado 4.13) y en los ensayos de linfoproliferación (apartado 4.25) fueron usados para determinar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) mediante análisis de la varianza (ANOVA), aplicando correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. El análisis estadístico se realizó empleando el software SPSS 15.0.1.









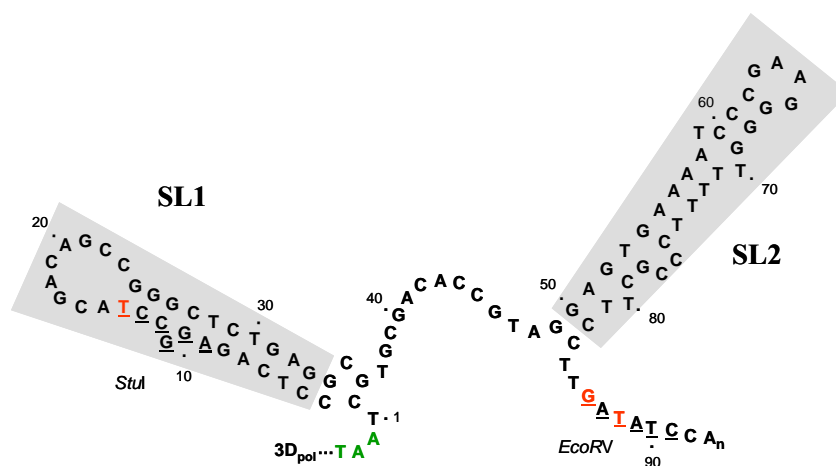
## **RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Estudio de los mecanismos de interacción que median la relación funcional entre los extremos 5' y 3' del genoma de FMDV

Algunos elementos estructurales presentes en las NCRs de FMDV participan en la regulación de la expresión génica del RNA viral, como el IRES, posiblemente el fragmento S en el extremo 5', y la 3'NCR del extremo 3' del genoma. La predicción de estructura secundaria de la 3'NCR de FMDV revela la presencia de dos estructuras estables de tipo “stem-loop”, SL1 y SL2, respectivamente (Figura 3). En trabajos previos se ha demostrado la esencialidad de la 3'NCR para la replicación e infectividad viral, así como su capacidad de estimular la traducción IRES-dependiente (Lopez de Quinto *et al.*, 2002; Saiz *et al.*, 2001), lo que sugiere la existencia de una interacción física entre los extremos 5' y 3' del genoma de FMDV. Esta interacción podría estar mediada por contactos directos RNA-RNA, por puentes proteicos o ambos. Con el fin de ahondar en el conocimiento de la funcionalidad de la 3'NCR, se realizaron ensayos de interacción con motivos estructurales presentes en el extremo 5' del genoma, analizando en cada caso la contribución de los elementos estructurales que la forman, y se estudió además su interacción con proteínas celulares.

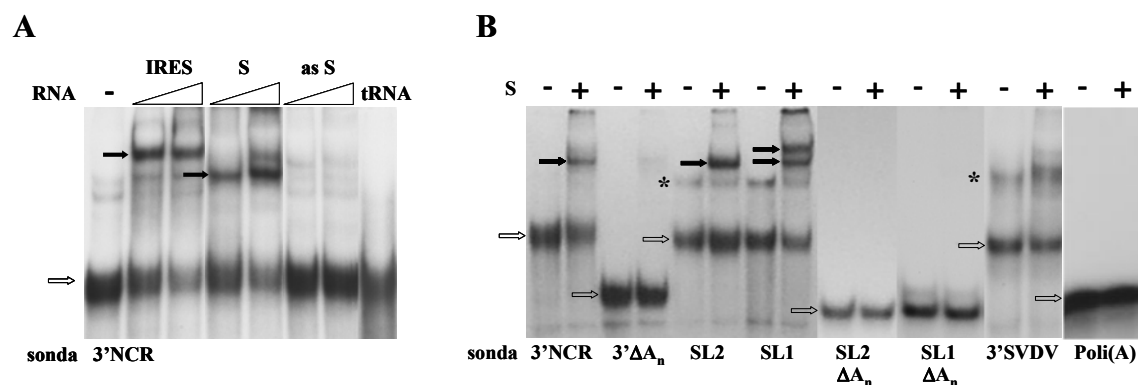


**Figura 3. Estructura secundaria de la 3'NCR de FMDV.** La predicción estructural se realizó utilizando el programa “mfold”. Las secuencias con fondo gris corresponden a las regiones delecionadas sobre un clon infeccioso de serotipo O (pO1K) para generar los mutantes O1K-ΔSL1 (nt 4 al 33) y O1K-ΔSL2 (nt 50 al 82). La numeración de nucleótidos se inicia a partir del codón “stop” del ORF (en color verde). En color rojo se indican los nucleótidos insertados o modificados en el clon pO1K para generar los sitios de restricción *StuI* y *EcoRV* (nucleótidos subrayados en el SL1 y en el 3' de la 3'NCR, respectivamente) para su manipulación.

### 5.1.1. Interacciones a nivel RNA entre las 5' y 3' NCRs

Para estudiar la posible interacción entre los extremos 5' y 3' del genoma de FMDV, se realizaron ensayos de interacción RNA-RNA en los que transcritos correspondientes a dos elementos estructurales distintos de las regiones 5'NCR, el fragmento S y el IRES (ver Figura 1) se incubaron con el transcrito de la 3'NCR incluyendo el poli(A) y se analizaron posteriormente las movilidades electroforéticas de los RNAs resultantes en geles nativos de poliacrilamida.

Los resultados de estos ensayos muestran que, cuando se incubaba el transcrito correspondiente a la 3'NCR (marcado radiativamente) con concentraciones crecientes de transcritos correspondientes al fragmento S o IRES, se detectan complejos de retardo específicos en los geles de poliacrilamida (Figura 4A), lo que indica que la 3'NCR interacciona con estas dos regiones del extremo opuesto 5'. La presencia en la reacción de transcritos S en versión antisentido o elevadas concentraciones de tRNA no dio lugar a la formación de complejos con la sonda 3'NCR (Figura 4A).

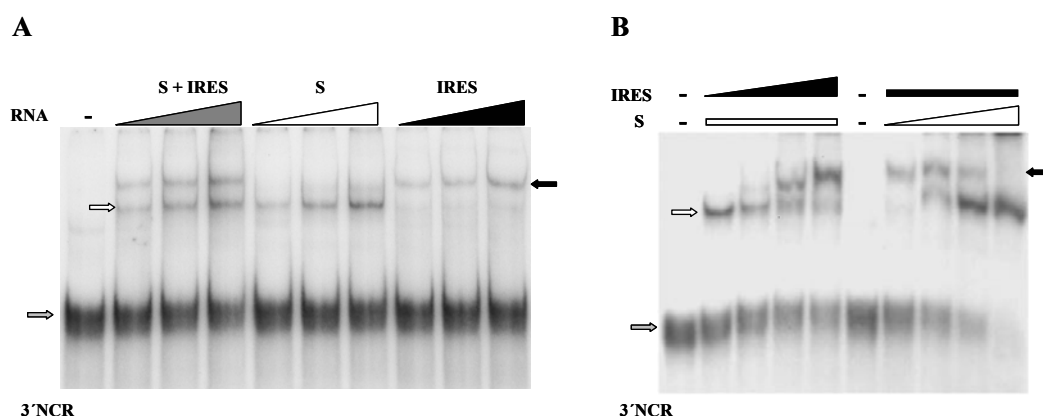


**Figura 4. Ensayos de interacción RNA-RNA entre elementos estructurales de las 5' y 3' NCRs de FMDV.** **A.** Interacciones entre transcritos de la 3'NCR marcados uniformemente (12,5 nM) y transcritos del fragmento S, IRES, fragmento S “antisentido” (as S) (0, 200, 400 nM) y con tRNA (400 nM). **B.** Interacción entre transcritos correspondientes al fragmento S (200 nM) con diferentes transcritos marcados uniformemente (12,5 nM) correspondientes a la 3'NCR completa y sus mutantes de delección (SL1 y SL2) con o sin sus respectivas colas de poli(A). Como controles específicos se emplearon la 3'NCR de SVDV y una sonda de poli(A). Los complejos se analizaron en geles nativos de poliacrilamida al 6%. Las flechas blancas indican la banda correspondiente al transcrito marcado radiativamente (sonda libre), las negras los complejos de retardo específicos y los asteriscos los dímeros de la correspondiente sonda.

La interacción S-3'NCR se mantuvo incluso con transcritos en los que cada uno de los SLs que forman la región habían sido delecionados independientemente, aunque

en el caso del SL1 el patrón de bandas observado fue distinto, detectándose un segundo complejo de migración más lenta (Figura 4B). En todos los casos (3'NCR completa,  $\Delta$ SL1 y  $\Delta$ SL2) la interacción con la región S fue estrictamente dependiente de la presencia del poli(A) en el RNA. Sin embargo, la sonda poli(A) por sí sola no fue capaz de formar complejos con el fragmento S (Figura 4B).

En los ensayos de interacción entre el fragmento S y el IRES no se detectó ningún complejo (dato no mostrado). Tampoco se detectaron complejos de interacción entre transcritos de la 3'NCR del picornavirus heterólogo SVDV y el fragmento S de FMDV (Fig 4B). Los resultados anteriores demuestran que la interacción entre los extremos 5' y 3' del genoma de FMDV es específica del virus y de cadena positiva. (Figura 4A, B).



**Figura 5. Ensayos de competición entre los RNAs S e IRES por la 3'NCR.** A. La sonda 3'NCR (12 nM) fue incubada con concentraciones crecientes (25, 50 y 100 nM) de transcritos correspondientes al fragmento S e IRES, combinadas en cantidades equimolares o individualmente. Las flechas negras y blancas indican la formación de complejos de retardo específicos con la región IRES y el fragmento S, respectivamente. B. Sonda 3'NCR incubada con concentraciones constantes (50 nM) de fragmento S, en presencia de concentraciones crecientes (0, 50, 500 y 1000 nM) de IRES (izquierda) o con concentraciones constantes (200 nM) de IRES, en presencia de concentraciones crecientes (0, 50, 200 y 800 nM) de fragmento S (derecha). Las concentraciones de fragmento S e IRES fueron elegidas en base a la eficiencia de la formación de los complejos. La migración de la sonda libre se indica con una flecha gris.

Para determinar si existía un posible efecto de competición entre las dos regiones analizadas del 5' por su interacción con la 3'NCR, la sonda 3' se incubó con concentraciones crecientes de transcritos IRES y S, bien simultáneamente o bien de forma independiente (Figura 5A). Los patrones de interacción obtenidos en caso de coincubación de los tres RNAs fue solapante con los obtenidos con las incubaciones

respectivas 3'NCR-S y 3'NCR-IRES, indicando que ambos elementos del 5' interaccionan con regiones distintas de la 3'NCR.

Con el fin de analizar si la secuencia 3'NCR era capaz de interaccionar simultáneamente con el S y el IRES, la sonda 3'NCR se incubó con distintas concentraciones de transcritos S o IRES, en presencia de una concentración fija del otro, respectivamente (Figura 5B). En estos ensayos no se detectaron complejos adicionales que pudieran reflejar la interacción simultánea de los tres RNAs y además, se observó la disminución simultánea de la eficiencia de formación de cada uno de los complejos a medida que se aumentaba la concentración del otro RNA. Esto indica que el fragmento S y el IRES no interaccionan simultáneamente con la 3'NCR.

Los requerimientos estructurales de la interacción IRES-3'NCR han sido estudiados por el grupo de Encarnación Martínez Salas y constituyen parte de un trabajo de tesis doctoral.

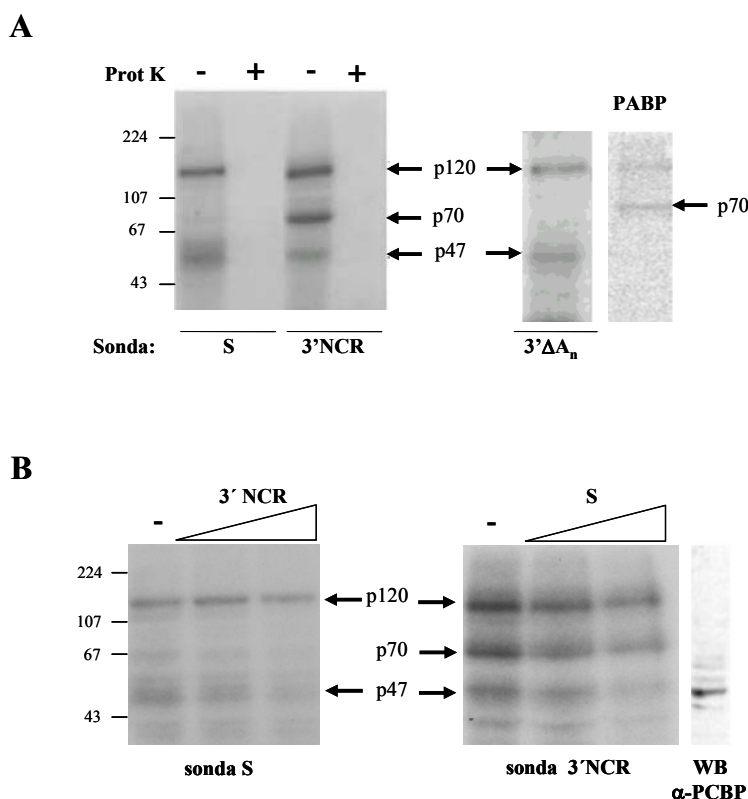
### ***5.1.2. Identificación y caracterización de proteínas celulares citoplásmicas que interaccionan con el fragmento S y la 3'NCR***

Demostrada la interacción entre las NCRs de FMDV a nivel RNA, tratamos de estudiar la posible implicación de proteínas celulares en estas interacciones. Previamente se habían descrito los patrones de interacción de proteínas presentes en extractos celulares citoplásmicos S10 con el IRES y la 3'NCR de FMDV (Fernandez-Miragall & Martinez-Salas, 2003; Lopez de Quinto *et al.*, 2002; Martinez-Salas *et al.*, 2002), careciéndose de información relativa al fragmento S.

Para la detección de proteínas celulares que pudiesen estar interaccionando con el fragmento S, se realizaron ensayos de “uv-crosslinking” entre transcritos correspondientes a este fragmento marcado radiactivamente y extractos S10 de células BHK-21. El patrón de proteínas resultante reveló la interacción específica de dos proteínas de aproximadamente 120 y 47 KDa (p120 y p47, respectivamente) con esta región (Figura 6A). Los dos productos detectados fueron sensibles al tratamiento con proteinasa K (Figura 6A). Comparando el patrón de proteínas obtenido para el fragmento S con los patrones de interacción del IRES y la 3'NCR, se observó que los pesos moleculares de las proteínas que interaccionan con el fragmento S eran



equivalentes a dos de las proteínas que interaccionaban con la 3'NCR (p120 y p47) (Figura 6A).



**Figura 6. Interacción de proteínas celulares con los RNAs correspondientes al fragmento S y la 3'NCR.** A. Patrón de interacción de proteínas del fragmento S y 3'NCR (0,03 pmol) y extractos S10 (20 µg) de células, tratadas o no con Proteinasa K (panel izquierdo), y patrón de interacción con proteínas del transcrito 3'NCR con la cola de poli(A) delecionada (panel central). Ensayo de inmunoprecipitación incubando la reacción de “uv-crosslinking” (3'NCR-S10) con un suero policlonal anti-PABP (panel derecho). B. Ensayos de competición entre 3'NCR y fragmento S por p47. El transcrito 3'NCR (sin marcar) en exceso molar de 50 y 200 veces se añadió al ensayo de “uv-crosslinking” entre fragmento S y extracto de proteínas (izquierda) y viceversa (derecha). En el extremo derecho se muestra un WB de un extracto de células BHK-21 incubado con un suero específico anti-PCBP1-2.

Para comprobar si estas proteínas, capaces de interaccionar con los extremos 5' y 3' eran las mismas, se realizaron ensayos de competición. Se observó que, preincubando los extractos de proteínas con RNA 3'NCR sin marcar, se producía un descenso en la interacción de p47 con la sonda S y viceversa (Figura 6B). Este resultado indica que p47 es un factor que interacciona con ambas regiones y, por tanto, podría cooperar en la circularización del genoma aproximando los extremos 5' y 3' del RNA viral. La movilidad electroforética de p47 coincide con la de un polipéptido presente en los extractos S10 que fue reconocido por un suero generado frente a PCBP1-2 (Figura

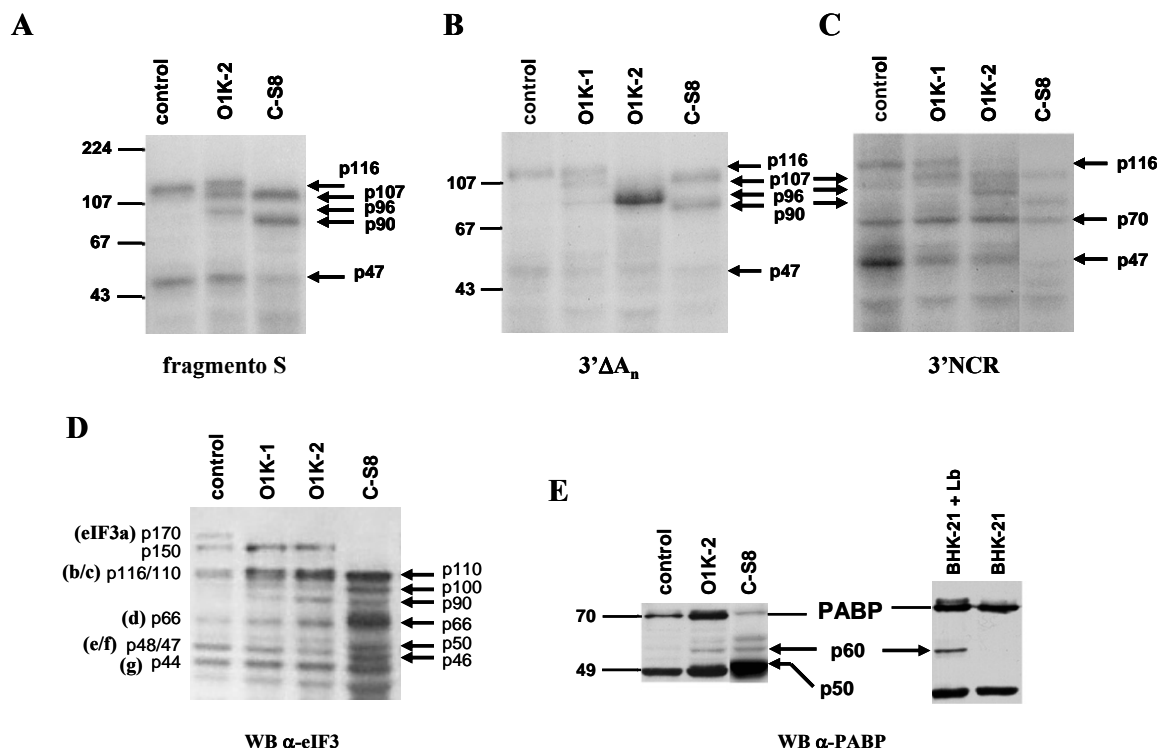
6B), una proteína cuya interacción con el “cloverleaf” del extremo 5’ del RNA de PV ha sido previamente descrita (Gamarnik & Andino, 1997).

Por otro lado, la proteína celular PABP, con capacidad de unión a residuos de adenina presentes en las secuencias de RNA (Baer & Kornberg, 1983), tiene un peso molecular de 72 KDa. Por ello, se trató de analizar si la proteína p70, detectada en ensayos de interacción de proteínas en extractos S10 con transcritos correspondientes a la 3’NCR de FMDV (Figura 6A, panel izquierdo), se correspondía con la proteína celular PABP. La desaparición de p70 del patrón de interacción de proteínas al incubar transcritos correspondientes a la 3’NCR con la cola de poli(A) deletcionada con extractos S10 (Figura 6A, panel central) y el reconocimiento específico de p70 en un ensayo de inmunoprecipitación de la reacción de interacción (“uv-crosslink”) por un suero específico anti-PABP (Figura 6A, panel derecho) indicaron que p70, efectivamente, era la proteína PABP. La interacción de PCBP y PABP con dominios estructurales de los extremos 5’ y 3’ del genoma puede tener un papel en la circularización del genoma de FMDV mediante puentes proteicos, de manera análoga a lo propuesto para PV (Gamarnik & Andino, 1998; Herold & Andino, 2001).

### ***5.1.2.1. Análisis del patrón de interacción con proteínas de extractos de células infectadas por FMDV***

Durante el transcurso de la infección por picornavirus, proteínas implicadas en traducción son proteolizadas por proteasas virales causando el “shutoff” traduccional en las células infectadas (Belsham *et al.*, 2000; Devaney *et al.*, 1988). Con el fin de analizar posibles cambios en el patrón de interacción de proteínas celulares con las NCRs de FMDV durante la infección, se realizaron ensayos de interacción entre los RNAs correspondientes a los dominios estructurales de las 5’ y 3’NCRs y las proteínas celulares presentes en los extractos citoplásmicos S10 de células infectadas por el virus. Para ello, se compararon los patrones de proteínas obtenidos para el fragmento S y la 3’NCR tras la incubación de los transcritos con extractos S10 de células BHK-21 sin infectar o bien infectadas a una MOI de 5 con dos aislados de FMDV genéticamente divergentes y con distintas capacidades de inducir CPE en líneas celulares susceptibles, O1K y C-S8. En el caso de O1K, los extractos S10 se prepararon a dos tiempos distintos post-infección (3 y 5 h, respectivamente), mientras que para el aislado C-S8, más rápido

en la inducción de CPE, se prepararon a 4 h post-infección, cuando el CPE era extensivo en toda la monocapa.



**Figura 7. Ensayos de interacción RNA-proteínas procedentes de células infectadas con aislados de FMDV.** O1K-1 y O1K-2 corresponden a extractos S10 procedentes de células infectadas con el aislado O1K, preparados a 3 y 5 h post-infección, respectivamente. Los extractos de células infectadas con C-S8 se prepararon a 4 h post-infección. Extractos S10 procedentes de células sin infectar fueron usados como controles **A**. Patrón de interacción del fragmento S con extractos S10 procedentes de células infectadas. **B** y **C**. Patrones de interacción del 3'NCR con la cola de poli(A) delecionada o la 3'NCR completa, respectivamente, con extractos S10 procedentes de células infectadas. En todos los casos las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. **D**. WB con un anticuerpo anti-eIF3 de los extractos indicados. Las flechas indican los nuevos polipéptidos detectables en extractos infectados. A la izquierda se indican los tamaños de las distintas subunidades de eIF3 (a-g). **E**. WB con un anticuerpo anti-PABP de extractos infectados con distintos aislados de FMDV (panel izquierdo) y de células transfectadas con un plásmido que expresa la proteasa viral Lb (panel derecho).

Los resultados de estos ensayos indicaron que las proteínas p47, p70 y p120 (esta última con migración equivalente a una p116 en estos ensayos) que interaccionaban con el fragmento S y/o la 3'NCR, se proteolizaron parcial o totalmente durante el transcurso de la infección viral. El grado de proteólisis dependió del aislado viral empleado (Figura 7A, B y C). Así, a expensas de la desaparición gradual de p116, dos nuevos productos, uno de 107 kDa y otro de 90 ó 96 kDa para O1K o C-S8,

respectivamente empezaron a detectarse en los patrones de interacción de proteínas obtenidos para el fragmento S y la 3'NCR (con y sin cola de poli(A)) (Figura 7A, B y C). Una p116 celular con capacidad de unión al IRES de FMDV ha sido identificada previamente como eIF3b (Lopez de Quinto *et al.*, 2001). Mediante WB con un anticuerpo específico se comprobó su presencia en extractos S10 de células BHK-21 sin infectar, así como su desaparición, junto con la de p170 (eIF3a), en los extractos infectados con FMDV. Nuevos péptidos de menor tamaño reconocidos por el anticuerpo fueron detectados también en los extractos infectados (Figura 7D). Este resultado indica que las subunidades a (p170) y b (p116) del factor de la traducción eIF3 sufren proteólisis durante la infección con FMDV.

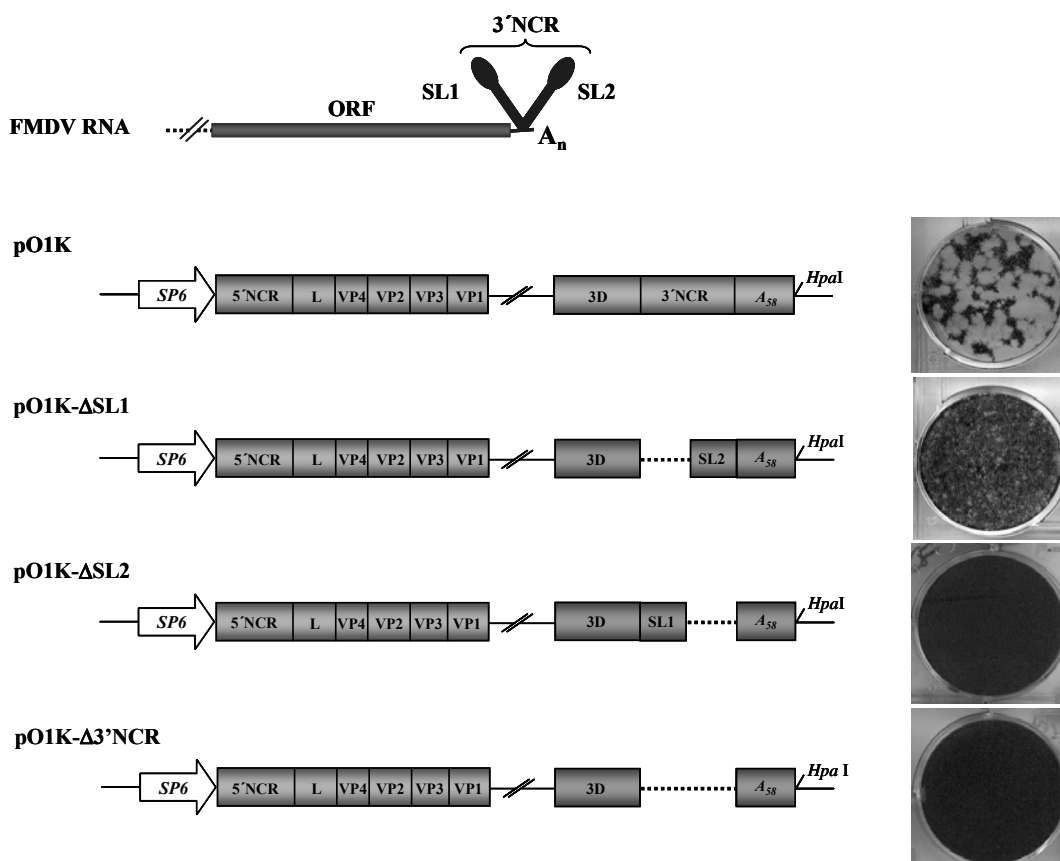
Respecto a p47, la intensidad de la interacción disminuyó considerablemente cuando se utilizaron extractos de células infectadas, especialmente con C-S8 (Figura 7A, B y C).

Mediante WB utilizando un anticuerpo específico anti-PABP se detectó la presencia de una proteína de igual movilidad en los extractos de BHK-21 sin infectar, mientras que una proteólisis parcial de PABP fue detectada en extractos de células infectadas con C-S8, y de manera menos pronunciada en células infectadas con O1K. El corte de PABP generó dos productos de 60 y 50 KDa, respectivamente (Figura 7E, panel izquierdo). La detección del producto de proteólisis p60 en extractos preparados a partir de células transfectadas con un plásmido que expresa la proteasa viral Lb empleando el suero anti-PABP, demostró que PABP sufre modificación proteolítica en células infectadas y que la proteasa Lb es parcialmente responsable de ese corte (Figura 7E, panel derecho). El hecho de que proteínas celulares que interaccionan con las NCRs de FMDV sufran proteólisis durante la infección puede tener relevancia en el ciclo viral y afectar a la expresión génica de la célula huésped, contribuyendo posiblemente al “shutoff” traduccional.

### ***5.2. Análisis mutacional de los motivos estructurales de la 3'NCR en cultivo celular***

Como continuación de la caracterización de la 3'NCR de FMDV, se analizó la contribución funcional independiente de cada uno de los dos SLs (SL1 y SL2) que la forman (Figura 3) al ciclo viral infeccioso. Para ello, se analizó la capacidad infectiva

de los RNAs generados a partir de las construcciones pO1K- $\Delta$ SL1 y pO1K- $\Delta$ SL2, en las que las regiones correspondientes a los SL1 y SL2 habían sido previamente deletionadas sobre un clon infeccioso de serotipo O (pO1K), respectivamente (Materiales y Métodos 4.3.1.). Los RNAs generados mediante transcripción *in vitro* a partir de las construcciones fueron transfectados en BHK-21 e IBRS-2 para ensayar su infectividad. Paralelamente, se transfectaron los transcritos derivados del clon parental pO1K y del clon pO1K- $\Delta$ 3'NCR (Saiz *et al.*, 2001) como controles positivo y negativo, respectivamente. La Figura 8 muestra los resultados de la transfección en IBRS-2 de los RNAs. Resultados equivalentes fueron obtenidos en células BHK-21.



**Figura 8. Efecto de la delección de los motivos estructurales en la 3'NCR de FMDV sobre la infectividad del RNA.** Representación esquemática de los RNAs ensayados y morfología de las placas de lisis generadas en IBRS-2 a 17 h p.t., en el caso del RNA O1K, o a 40 h p.t. para los distintos RNAs mutantes. Las cantidades de RNA transfectadas oscilaron entre 250 ng y 10  $\mu$ g.

La delección del SL2, al igual que la de la 3'NCR completa, resultó deletérea para la infectividad del RNA. Sin embargo, la delección del SL1 no eliminó la capacidad

infectiva del RNA, aunque sí se observó un retraso en la aparición de CPE de aproximadamente 24 h, independientemente de la dosis de RNA, y una morfología de placa distinta respecto al virus O1K. Los virus O1K-ΔSL1 produjeron placas notablemente más pequeñas, de tipo “punta de alfiler” (Figura 8).

Los transcritos de RNA O1K indujeron CPE detectable en células transfectadas a las 17 h p.t., mientras que para el RNA O1K-ΔSL1 se observó alrededor de las 40 h p.t. La infectividad específica calculada para el RNA O1K-ΔSL1 fue de  $10^3$  PFU/μg, aproximadamente 10 veces menos que la obtenida con el transcrito O1K (Saiz *et al.*, 2001).

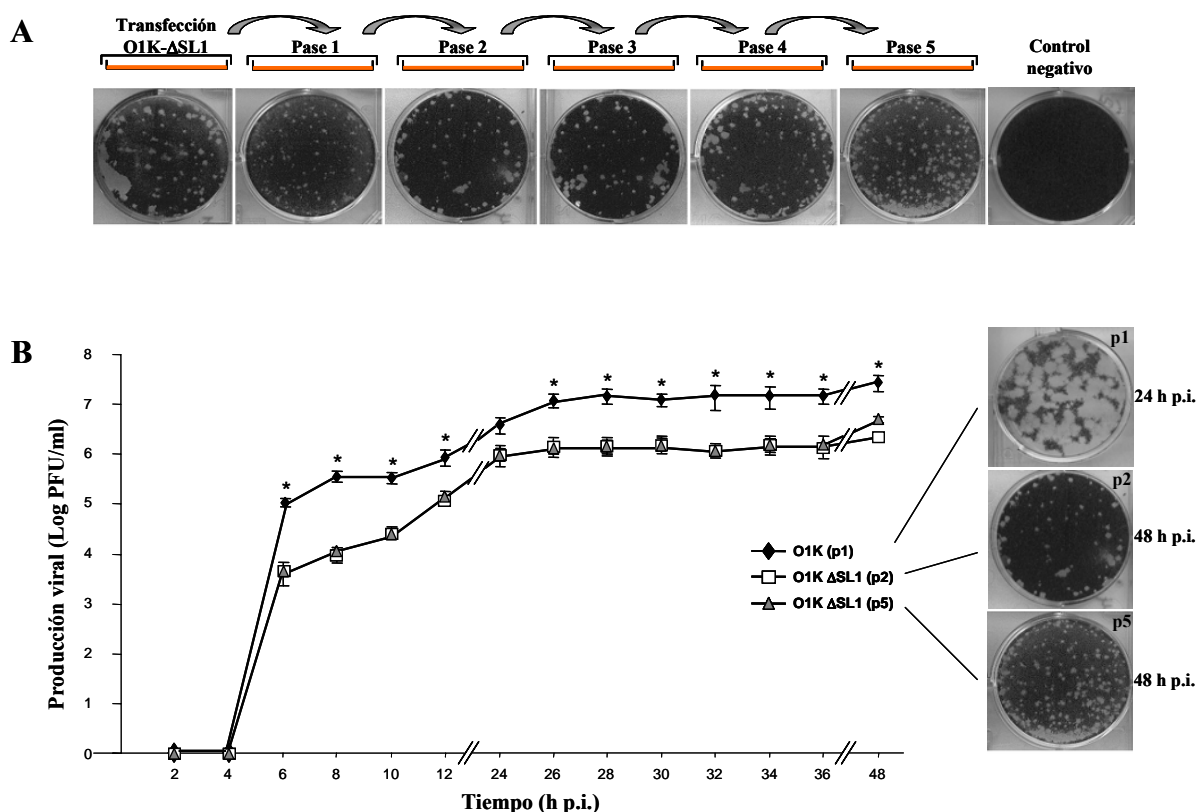
La incapacidad de obtener progenie viral a partir de los RNAs O1K-ΔSL2 se confirmó al no poderse recuperar virus tras dos pases ciegos seriados en cultivo celular, indicando la esencialidad del SL2 en el ciclo viral infeccioso.

### ***5.3. Caracterización del mutante O1K-ΔSL1 en cultivo celular***

Los virus O1K con el SL1 de la 3'NCR delecionado fueron analizados en cuanto al fenotipo de placa producido tras pases seriados en cultivo y su cinética de crecimiento. Se estudió también su estabilidad genética y su capacidad replicativa en cultivo celular.

#### ***5.3.1. Análisis del fenotipo de placa***

Inicialmente, se determinó si el fenotipo de placa pequeña observado para el virus O1K-ΔSL1 se mantenía tras su pase seriado en células susceptibles como un indicio preliminar de su estabilidad genética. Para ello, se transfectaron células BHK-21 e IBRS-2 con transcritos derivados de las construcciones pO1K-ΔSL1 y pO1K, este último como control. A continuación, alícuotas correspondientes al lisado por congelación-descongelación de las monocapas transfectadas junto con el sobrenadante de transfección en un volumen final de 100 μl, se inocularon sobre las correspondientes células BHK-21 o IBRS-2 y así sucesivamente hasta completar cinco pases seriados.



**Figura 9. Morfología de placa y cinética de crecimiento de los virus O1K-ΔSL1.** A. Análisis del fenotipo de placa del virus O1K-ΔSL1 tras pases seriados en IBRS-2. Los plaques de los sobrenadantes de infección corresponden a 48 h p.i. usando un volumen de 100  $\mu$ l como inóculo. La placa correspondiente a la transfección se fijó a las 72 h. p.t. B. Representación de la cinética de crecimiento en IBRS-2 del virus O1K tras un pase en cultivo (p1) y del virus O1K-ΔSL1 correspondiente a los pases 2 y 5 (p2 y p5). En todos los casos las células IBRS-2 fueron infectadas empleando una MOI de 0,1. El recuento de PFU se realizó mediante ensayos de plaqueo en medio con agar semisólido a los tiempos indicados. El valor representado corresponde al promedio de al menos tres ensayos independientes. La barra de error en cada punto indica la desviación estándar y los asteriscos las diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tres virus ensayados.

El análisis del fenotipo de placa se realizó plaqueando los correspondientes sobrenadantes de cada uno de los pases seriados en medio con agar semisólido, tanto en BHK-21 como en IBRS-2. En el apartado A de la Figura 9 se muestra la morfología de placa de los virus generados tras cada pase en IBRS-2 a 48 h post-infección. En los cinco pases realizados sobre IBRS-2 no se observaron diferencias significativas en el tamaño y morfología de placa generadas por el virus O1K-ΔSL1 con respecto a las observadas en la transfección inicial empleando RNA O1K-ΔSL1. Resultados idénticos se obtuvieron utilizando células BHK-21.

Estos resultados sugerían la estabilidad del genotipo O1K  $\Delta$ SL1, aún después de varias rondas de replicación y pases seriados en líneas celulares susceptibles.

### ***5.3.2. Cinética de crecimiento de virus***

Continuando con la caracterización del genotipo O1K- $\Delta$ SL1, se comparó la cinética de producción de virus del mutante respecto a la del virus O1K en células IBRS-2.

La curva de crecimiento se realizó titulando los sobrenadantes recogidos a distintos tiempos (ver Figura 9B) tras una infección a una MOI de 0,1 utilizando tres poblaciones virales distintas: a) virus O1K obtenido en la infección del primer pase seriado en cultivo (p1), b) virus O1K- $\Delta$ SL1 obtenido tras el segundo (p2) o c) quinto pase seriado en cultivo (p5).

Como se observa en la Figura 9 en su apartado B, el título viral de O1K- $\Delta$ SL1 alcanzado en cada uno de los tiempos analizados, independientemente del pase en cultivo celular (p2 o p5), siempre fue entre 10 y 15 veces menor que el del virus parental O1K, incluso a 48 h post-infección. Sin embargo, las cinéticas de crecimiento de los virus O1K- $\Delta$ SL1 de pase 2 y 5 fueron similares en todos tiempos analizados.

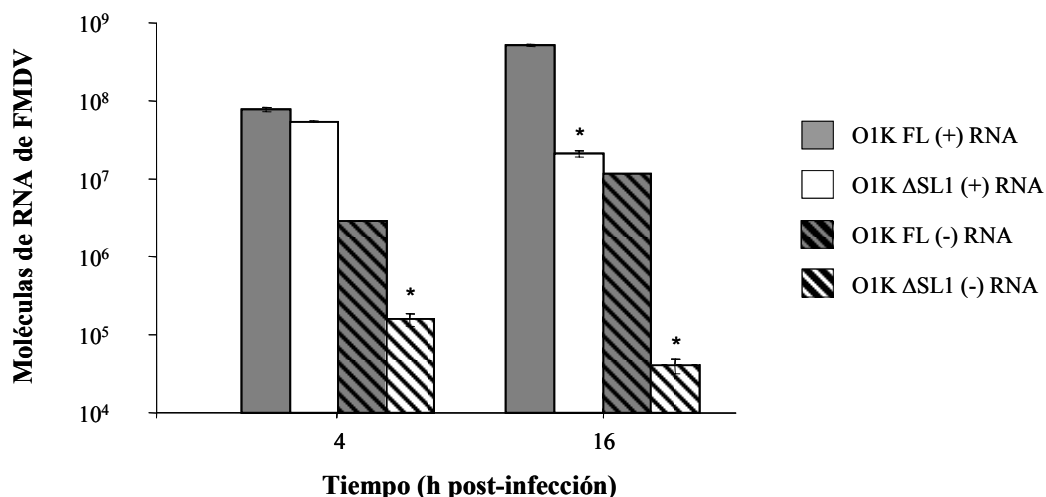
Estos resultados indican que la delección del SL1 en la 3'NCR genera un virus de crecimiento más lento que el virus parental, incapaz de alcanzar los niveles de producción viral de su parental O1K, aún después de cinco pases en cultivo celular.

### ***5.3.3. Capacidad replicativa***

Los resultados obtenidos anteriormente sugerían que el mutante O1K- $\Delta$ SL1 podía tener disminuida su capacidad de replicar. Con el objetivo de analizar si la delección del SL1 de la 3'NCR está afectando a la síntesis de cadena positiva y/o negativa, se realizó una cuantificación de las moléculas de RNA viral de ambas polaridades en células BHK-21 transfectadas mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de cadena (+) y (-). Los niveles de síntesis de RNA (+) y (-) se compararon con los del virus parental O1K transfectado en paralelo. El RNA citoplásmico fue extraído a 4 y 16 h p.t. (ver apartado 4.13). La elección de estos dos tiempos se hizo en base al tiempo de aparición de CPE en las células transfectadas. A las 16 h p.t. con el transcrito O1K de longitud completa las células transfectadas están



entrando en la fase citopática aunque todavía están adheridas a las placas, mientras que en las células transfectadas con el transcrito O1K- $\Delta$ SL1 no se observa ningún indicio de CPE a este tiempo. El tiempo de 4 h p.t. se eligió por analizar un punto de síntesis activa de RNA previo a la aparición de CPE.



**Figura 10. Cuantificación por RT-PCR a tiempo real del número de moléculas de RNA viral de cadena positiva y negativa en células BHK-21 transfectadas con transcritos O1K y O1K- $\Delta$ SL1.** Cada columna representa el valor promedio y la desviación estándar (barras de error) del número de copias por ng de RNA citoplásmico a partir de determinaciones por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre O1K y O1K- $\Delta$ SL1 para cada una de las cadenas (positiva o negativa) en los tiempos indicados.

Para la amplificación específica de cadena de polaridad (+) o (-), respectivamente, se desarrolló un protocolo basado en la adaptación de los cebadores A/B, previamente diseñados para la amplificación de un fragmento del gen de la polimerasa viral (3D) por RT-PCR convencional, a RT-PCR en tiempo real. El protocolo se ha descrito detalladamente en Materiales y Métodos (apartado 4.13).

En la Figura 10 se representa el número de moléculas de RNA de cadena positiva y negativa a 4 y 16 h p.t. en células BHK-21 transfectadas con los transcritos O1K y O1K- $\Delta$ SL1. A 4 h p.t. no se observaron diferencias significativas en la síntesis de cadena positiva entre ambos RNAs, sin embargo, a 16 h p.t. sí se produjo un descenso de RNA de polaridad positiva en células transfectadas con O1K- $\Delta$ SL1 de 1,3 log con respecto al RNA O1K.

Las mayores diferencias entre células transfectadas con cada RNA se observaron en la síntesis de cadena negativa a ambos tiempos post-transfección. En células

transfectadas con transcritos O1K-ΔSL1 la cantidad de moléculas de RNA viral de cadena negativa fue muy inferior a los niveles detectados en células transfectadas con RNA O1K y esta diferencia se incrementó con el tiempo p.t. Así, mientras a 4 h p.t. la síntesis de cadena negativa a partir del RNA O1K es casi 20 veces superior a la del RNA O1K-ΔSL1, este valor se incrementó hasta casi las 300 veces a 16 h p.t. (Tabla 4).

**Tabla 4. Valores absolutos y relativos del número de moléculas de RNA de FMDV de cadena positiva y negativa determinados mediante RT-PCR en tiempo real en células transfectadas con los RNAs O1K y O1K-ΔSL1**

RNA transfectado	Tiempo (h p.t.)	Copias RNA (+) (x 10 <sup>7</sup> )	Copias RNA (-) (x 10 <sup>5</sup> )	Proporción positiva/negativa	Proporción positiva /positiva (O1K/O1K-ΔSL1)	Proporción negativa/negativa (O1K/O1K-ΔSL1)
O1K	4	7,7	29	26,5	1,42 <sup>a</sup>	18,35 <sup>a</sup>
O1K-ΔSL1	4	5,4	1,58	341,77		
O1K	16	52	117	44,4	24,76 <sup>b</sup>	292,5 <sup>b</sup>
O1K-ΔSL1	16	2,1	0,4	521,09		

7,5 x 10<sup>6</sup> células BHK-21 fueron transfectadas con 2,5 μg de RNA. Los valores absolutos corresponden al número de moléculas de RNA por ng de RNA citoplásmico extraído de las células transfectadas con el transcrito indicado y representan el valor promedio de ensayos cuádruplicados.

<sup>a</sup>Proporción a 4 h p.t.

<sup>b</sup>Proporción a 16 h p.t.

Por otro lado, la proporción entre moléculas de cadena positiva y negativa a ambos tiempos p.t. fue consistentemente un log superior para el RNA O1K-ΔSL1 con respecto a O1K de longitud completa (Tabla 4), indicando que el mutante de delección O1K-ΔSL1 es defectivo para la síntesis de RNA viral de cadena negativa.

El conjunto de estos resultados demuestra que la delección del SL1 en la 3'NCR va asociada a un defecto en la síntesis de RNA de cadena negativa, generando virus con menor capacidad de replicación y crecimiento más lento en cultivo celular.

#### **5.3.4. Estabilidad genética**

Para determinar si el genotipo mutante O1K-ΔSL1 era estable tras sucesivos pases en cultivo celular, se analizó la secuencia de los virus generados después de cinco pases citolíticos en BHK-21 e IBRS-2. Los resultados obtenidos al analizar el fenotipo de placa de los virus pasados en cultivo, descritos en el apartado 5.3.2, sugieren que no

se ha producido una reversión o pseudoreversión que cambiaría posiblemente la morfología de placa a un tamaño normal.

**Tabla 5. Cambios en la secuencia de las proteínas 2C y 3C de O1K y O1K-ΔSL1 pasados en cultivo celular**

RNA	Línea celular	Serie <sup>a</sup>	Transfección		Pase 1		Pase 5	
			2C	3C	2C	3C	2C	3C
O1K-ΔSL1	BHK-21	A*	+	-	+	+/-	+	+
		B	-	-	+	+	+	+
	IBRS-2	A	-	-	+	-	+	-
		B	-	-	-	-	-	-
O1K	BHK-21	A, B	-	-	-	-	-	-
	IBRS-2	A, B	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Las transfecciones y pases correspondientes a las series A y B se iniciaron con transcritos de RNA O1K y O1K-ΔSL1 de síntesis independientes.

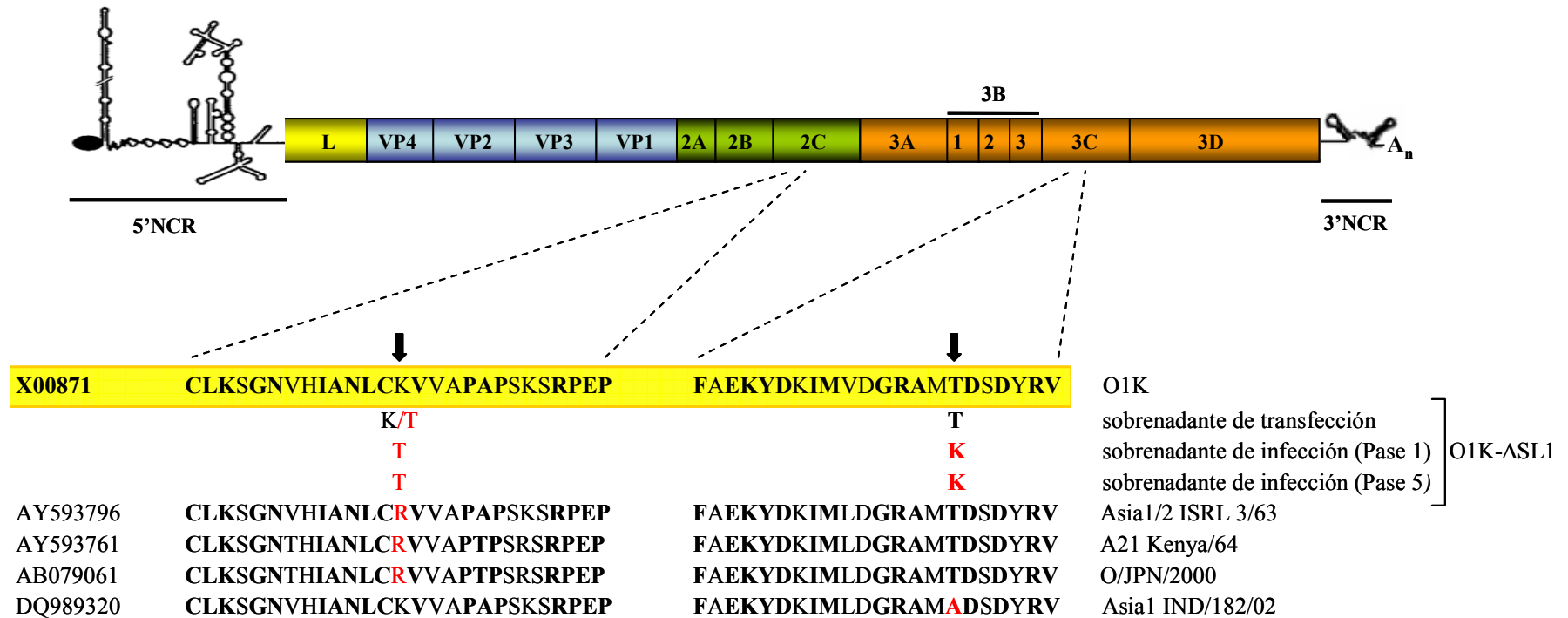
El signo (+) indica la sustitución en 2C K90→T o T63→K en 3C con respecto a la secuencia EMBL PIFMDV2 con número de acceso X00871 (GenBank). (+/-) indica mezcla de aminoácidos (K y T) en la posición 63 de 3C en la población viral del pase indicado.

\*Indica la secuenciación del genoma completo de los virus O1K-ΔSL1 recuperados en BHK-21 de transfección, pase 1 y pase 5 de la serie A.

Para llevar a cabo este análisis, los RNAs O1K y O1K-ΔSL1 se transfectaron en BHK-21 e IBRS-2 por duplicado (series A y B) utilizando en cada serie transcritos sintetizados en reacciones independientes. A continuación, para cada serie se realizaron cinco infecciones citolíticas seriadas en las mismas líneas celulares, empleando como inóculo el sobrenadante de infección del pase anterior.

En todos los virus recuperados, tanto de los sobrenadantes de transfección como de todos los sobrenadantes de infección de los cinco pases seriados en ambas líneas celulares (BHK-21 e IBRS-2), se confirmó la presencia de la delección de los 29 nt del SL1 en la 3'NCR y la ausencia de cambios adicionales en esta región.

Tras comprobar la estabilidad de la secuencia de la 3'NCR, el resto del genoma viral también se secuenció con el fin de identificar posibles cambios asociados a la delección. Para ello, se amplificó y secuenció la 5'NCR y el ORF del virus O1K-ΔSL1, recuperado a partir del sobrenadante de transfección y de las infecciones correspondientes a los pases 1 y 5 en BHK-21. En ningún caso se encontraron cambios



**Figura 11. Cambios en la secuencia de las proteínas no estructurales 2C y 3C en aislados de FMDV y virus O1K-ΔSL1 pasados en BHK-21.** En cada caso se indica la referencia del aislado en el que se han encontrado cambios en su secuencia y el número de acceso correspondiente en la base GenBank. Con flechas se indican las posiciones 90 y 63 en las proteínas virales 2C y 3C, respectivamente. En rojo se muestran los cambios en la secuencia con respecto a O1K y en negrita las posiciones conservadas según Carrillo *et al.* 2005.

en las 5'NCRs de los genomas analizados. Sólo se detectaron dos sustituciones a lo largo del ORF de los virus recuperados en la línea BHK-21 en algunos casos (Tabla 5). Estos cambios de aminoácidos fueron Lys-90→Thr y Thr-63→Lys en las proteínas 2C y 3C, respectivamente. Para estimar la prevalencia de esas sustituciones en los virus O1K y O1K-ΔSL1 a lo largo de los distintos países y líneas celulares, las regiones comprendidas entre las posiciones 4.041 a 4.495 y 5.669 a 6.307 de los genes que codifican las proteínas 2C y 3C fueron amplificadas con los cebadores SB7O1K/SB8 y 3C1/SB10, respectivamente, y secuenciadas (Tabla 1, Figura 2) en todos los casos (Tabla 5).

La sustitución en la posición 90 de 2C se detectó también en dos de los seis genomas analizados procedentes de países en la línea IBRS-2, mientras que la sustitución en 3C no se detectó en IBRS-2 en ningún caso. En los virus O1K generados tras los pases equivalentes en BHK-21 e IBRS-2 tampoco se detectaron sustituciones en las regiones analizadas de 2C y 3C.

La posición 90 de 2C es una posición variable entre aislados de FMDV. Al contrario, la posición 63 en 3C está considerada como ampliamente conservada entre aislados (Carrillo *et al.*, 2005). Analizando las distintas bases de datos y las secuencias disponibles de esa región, se encontró un aislado indio de serotipo ASIA 1 con un residuo de alanina en lugar de treonina en la posición 3C-63 (Figura 11). En cualquier caso, no hay información disponible en la actualidad que sugiera que esas dos posiciones sean relevantes para la funcionalidad de las proteínas 2C y 3C, respectivamente. El hecho de que no siempre sean encontradas en la línea porcina IBRS-2 apoya también la hipótesis de que esos cambios no son necesarios para la viabilidad del mutante O1K-ΔSL1.

#### **5.4. Análisis de la infectividad del RNA O1K-ΔSL1 y progenie viral en ratón lactante**

Durante los primeros días de vida los ratones son susceptibles a la inoculación intraperitoneal de virus y transcritos de RNA infecciosos, causándoles parálisis del tracto posterior, temblores y la muerte en pocos días (Baranowski *et al.*, 2003; Skinner, 1951). La inoculación con transcritos infecciosos de FMDV genera virus infeccioso y transmisible a otros ratones lactantes mediante inoculación intraperitoneal de homogenados de animales inoculados con RNA (Baranowski *et al.*, 2003).

En ensayos previamente descritos, la inoculación intraperitoneal del transcrito de RNA derivado del clon infeccioso pO1K no causó enfermedad ni muerte en lactantes, aunque sí resultó letal la inoculación del virus recuperado de transfección con RNA O1K y posterior pase en BHK-21, con un título de  $10^7$  PFU/ml, alcanzando un título en lactante de  $1 \times 10^3$  DL<sub>50</sub>/ml (Baranowski *et al.*, 2003). Este modelo de ensayo de virulencia en ratón lactante fue utilizado para analizar de forma preliminar la infectividad del RNA O1K-ΔSL1 *in vivo*.

Se comprobó que inoculando cantidades elevadas de RNA (100 µg) ninguno de los animales inoculados con el transcrito O1K-ΔSL1 murió o mostró signos de enfermedad (Tabla 6). Se había descrito que cantidades 1000 veces inferiores de un transcrito quimérico O1K/C-S8 eran todavía capaces de matar aproximadamente a un tercio de los ratones inoculados (Baranowski *et al.*, 2003). Estos resultados indican que el genotipo O1K-ΔSL1 está atenuado en ratón lactante.

No obstante, para confirmar que este RNA no generaba progenie viral infecciosa en los animales inoculados, nuevos ratones lactantes se inocularon con homogenados preparados a partir de cerebro y músculo de las extremidades posteriores de los ratones inoculados previamente con RNA O1K-ΔSL1.

**Tabla 6. Resultados del ensayo de infectividad en ratón lactante del RNA o virus O1K-ΔSL1**

Dosis RNA	Animales muertos /inoculados	Virus <sup>a</sup>	Animales muertos /inoculados	Homogenado <sup>b</sup>	Animales Muertos /inoculados
100 µg	0/4	$10^0$	0/2	$10^{-1}$	0/2
		$10^{-1}$	0/11	$10^{-2}$	0/2
		$10^{-2}$	0/11		
		$10^{-3}$	0/13		
		$10^{-4}$	0/11		
		$10^{-5}$	0/10		
		$10^{-6}$	0/11		

<sup>a</sup>Diluciones de sobrenadante de infección de pase 2 en BHK-21 de virus O1K-ΔSL1 recuperado de transfección. El título del stock viral empleado fue de  $7,2 \times 10^5$  PFU/ml.

<sup>b</sup>Diluciones de homogenado (cerebro y músculo de patas traseras) de animales inoculados con 100 µg de RNA O1K-ΔSL1 y sacrificados a día 10 p.i.  
El RNA, las diluciones de virus y los homogenados se inocularon intraperitonealmente.

El resultado de este ensayo de transmisión de virulencia en ratón lactante indicó que ninguno de los animales inoculados con los extractos murió, confirmando de nuevo la atenuación en ratón lactante del RNA O1K- $\Delta$ SL1 (Tabla 6), de manera análoga a su RNA parental O1K (Baranowski *et al.*, 2003).

Resultados equivalentes se obtuvieron inoculando virus O1K- $\Delta$ SL1. Diluciones seriadas de un sobrenadante de infección obtenido tras una transfección y 2 pases en BHK-21, inoculadas intraperitonealmente, resultaron inocuas para los ratones lactantes (Tabla 6), a diferencia del virus parental O1K, que inoculado como sobrenadante viral resultaba infeccioso (Baranowski *et al.*, 2003).

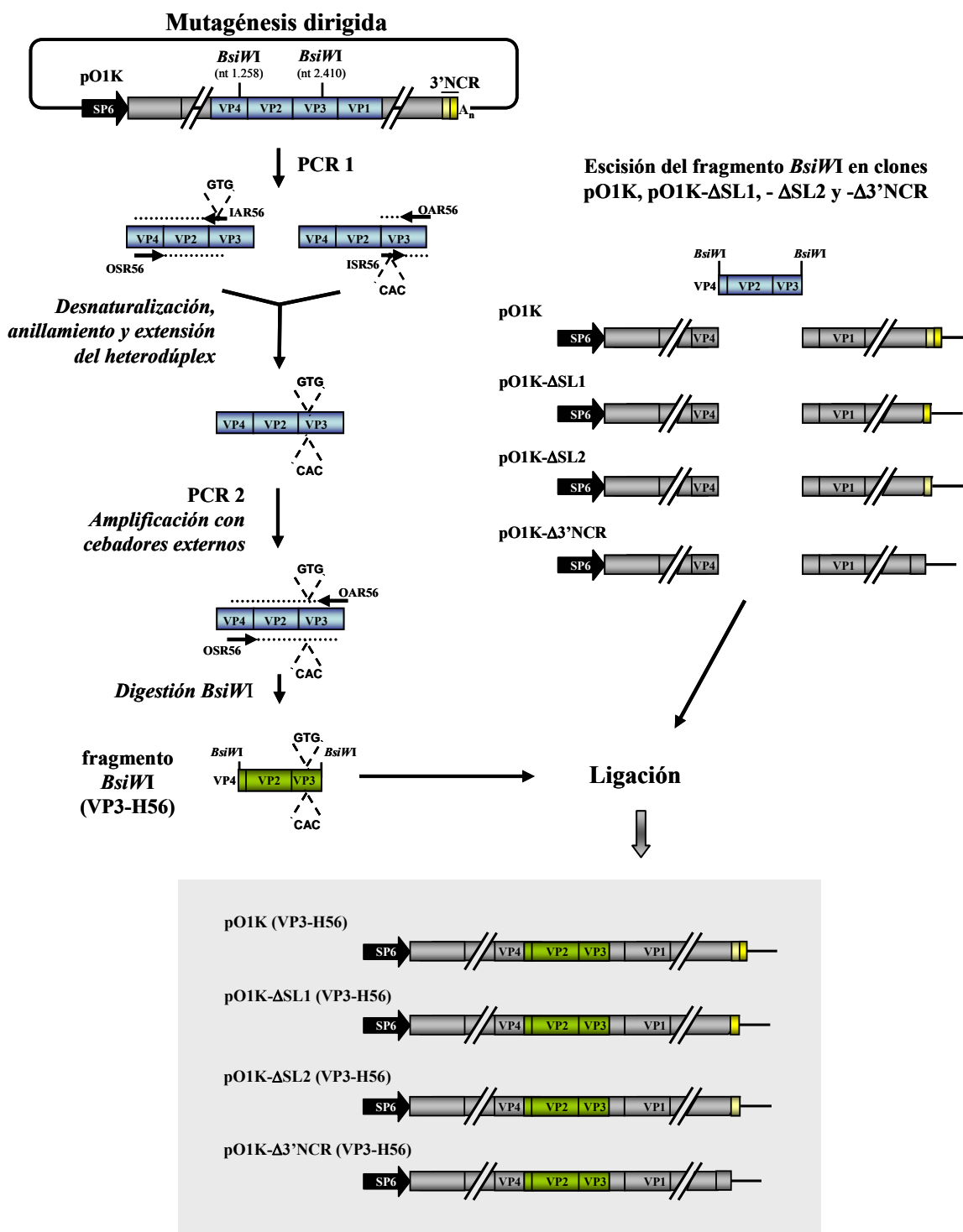
El conjunto de estos resultados indica que tanto el RNA O1K- $\Delta$ SL1 como la progenie viral recuperada a partir de él en cultivo celular están atenuados en ratón lactante.

#### **5.5. Generación de las plásmidos *pO1K*, *pO1K- $\Delta$ SL1*, *pO1K- $\Delta$ SL2* y *p $\Delta$ 3'NCR* en versión *VP3-H<sub>56</sub>***

La adaptación a cultivo celular de aislados de FMDV de serotipo O conlleva la selección de variantes que utilizan HS como receptor celular. La presencia de un residuo de arginina (cargado positivamente) en la posición 56 de VP3 determina la afinidad del virus O1K por este receptor en cultivo celular y la atenuación en bovino, a diferencia del virus homólogo aislado de campo, o de bajo número de pases en cultivo, que presenta una histidina en esta misma posición (Jackson *et al.*, 1996; Jensen & Moore, 1993; Sa-Carvalho *et al.*, 1997).

Con el objetivo de ensayar genotipos derivados del clon infeccioso de O1K, que pudieran tener mejor capacidad de replicación en animal, se realizó una mutagénesis dirigida sobre el clon infeccioso para sustituir la arginina en posición 56 de VP3 por histidina, presente en esta posición en el aislado natural.

La estrategia de mutagénesis y clonación está detallada en el apartado 4.14 y esquematizada en la Figura 12. La sustitución del aminoácido en posición 56 de VP3 se realizó mediante PCR recombinante en la que a través los cebadores internos (ISR56 y IAR56) se introducía la mutación puntual G<sub>2392</sub>→A sobre el clon infeccioso pO1K, generando el cambio de aminoácido R56→H en la proteína estructural VP3.



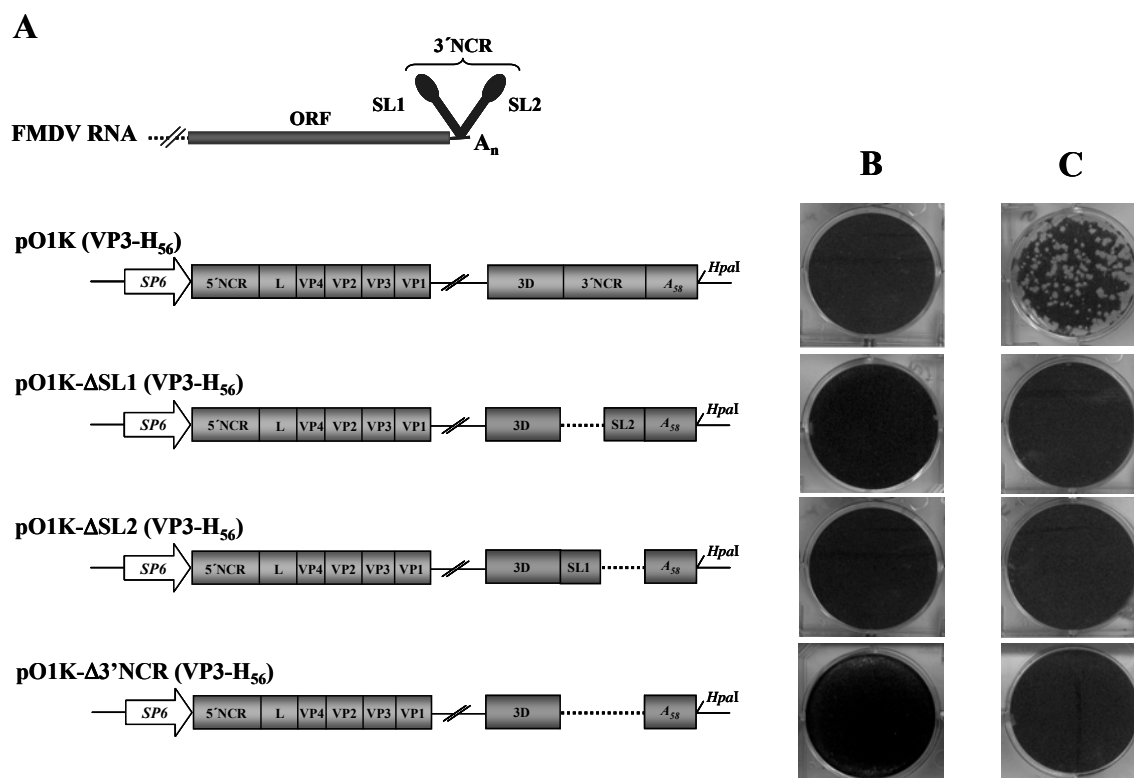
**Figura 12. Generación de variantes VP3-H56.** Representación esquemática de la estrategia empleada para la mutagénesis VP3-56 Arg→His. El producto final de PCR, digerido con *BsiWI* [fragmento *BsiWI* (VP3-H56)], se clonó en los plásmidos (pO1K, pO1K-ΔSL1, pO1K-ΔSL2 y pO1K-Δ3'NCR), previa escisión del sitio *BsiWI* en cada uno de ellos. La secuencia y posición de los cebadores están indicadas en materiales y métodos (tabla 3).



El fragmento generado finalmente en la PCR de extensión con los cebadores externos OSR56 y OAR56 se digirió con la enzima de restricción *BsiWI* y se clonó el plásmido pO1K y sus derivados de delección en la 3'NCR (pO1K-ΔSL1, pO1K-ΔSL2 y pO1K-Δ3'NCR), previa escisión del fragmento *BsiWI*, generándose los correspondientes variantes en versión VP3-H<sub>56</sub>.

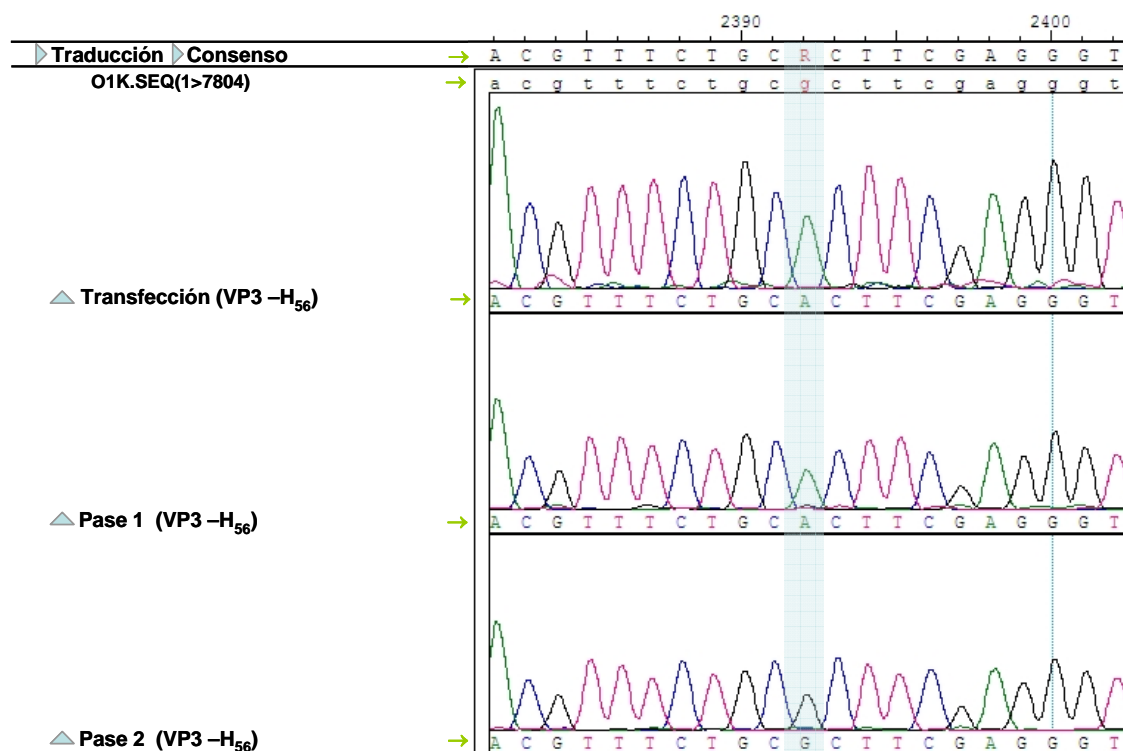
### 5.5.1. Ensayos de infectividad en cultivo celular de los RNAs derivados de las construcciones O1K en versión VP3-H<sub>56</sub>

Una vez obtenidas todas las construcciones (pO1K, pO1K-ΔSL1, pO1K-ΔSL2 y pO1K-Δ3'NCR) con un residuo de histidina en la posición 56 de la proteína VP3, se procedió a transfectar células BHK-21 e IBRS-2 con los transcritos derivados de ellas, como paso previo a su ensayo en animales.



**Figura 13. Efecto de la sustitución Arg→His en VP3-56 en la infectividad de los RNAs O1K, O1K-ΔSL1, -ΔSL2 y -Δ3'NCR en cultivo celular.** **A.** Representación esquemática de las construcciones. **B.** Resultado de la transfección con 10 μg de los distintos RNAs derivados de las construcciones VP3-H<sub>56</sub> en agar semisólido tras 48 h p.t. **C.** Ensayos de infección en IBRS-2 en agar semisólido con los sobrenadantes de transfección obtenidos en B, a las 48 h p.i

Como se muestra en la Figura 13B, no se pudo observar CPE en las células transfectadas con ninguna de las dosis de transcritos ensayadas (1, 5 y 10  $\mu$ g), incluso a día 6 p.t. No obstante, se intentó aislar virus a partir de los ensayos de transfección mediante dos pases consecutivos en cultivo tras tres ciclos de congelación-descongelación. Sólo el RNA transcrito del clon O1K (VP3-H<sub>56</sub>) indujo CPE tras el primer pase en cultivo celular (Figura 13C), siendo capaz de lisar la monocapa completamente a las 48 h post-infección, independientemente de la cantidad de RNA transfectada inicialmente, mientras que los mutantes de delección en la 3'NCR no indujeron CPE. La imposibilidad de aislar virus O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cultivo celular indica la incapacidad de este genotipo para replicar en cultivo.



**Figura 14. Cromatogramas correspondientes a las secuencias de la región VP3-56 de los virus generados en transfección con RNA O1K (VP3-H<sub>56</sub>) y dos pases en IBRS-2.** La posición 56 de VP3 corresponde al nucleótido 2.392 en la secuencia mostrada y está referida a la secuencia de O1K (EMBL PIFMDV2 con número de acceso X00871). En la figura se muestra el cambio de aminoácido H56→R debido a la sustitución del nucleótido A2392→G. Las muestras denominadas “transfección”, “pase 1” y “pase 2” corresponden a la secuencia de los virus recuperados a partir de la transfección con RNA O1K (VP3-H<sub>56</sub>), primer y segundo pase en cultivo celular, respectivamente. El análisis de las secuencias, obtenidas por secuenciación automática, se realizó empleando el software *DNA Star 5.01* (Lageregene).

El análisis de la secuencia de la región VP3 de la progenie viral O1K, recuperada tras la transfección del RNA O1K (VP3-H<sub>56</sub>) y el primer y segundo pase en IBRS-2 demuestra la rápida adaptación a cultivo celular del genotipo O1K. Así, el cambio H56→R se pudo detectar ya en la población viral recuperada tras el primer pase en cultivo como mezcla con H, y en toda la población viral del segundo pase (Figura 14). Este resultado confirma la rápida fijación del cambio A<sub>2393</sub>→G en el genoma O1K como consecuencia de su crecimiento en cultivo celular, con la dificultad inherente de generar virus con una His en posición VP3-56.

#### ***5.5.2. Ensayos de infectividad en ratón lactante de los RNAs derivados de las construcciones O1K en versión VP3-H<sub>56</sub>***

Anteriormente se ha demostrado el fenotipo deficiente en replicación del genotipo O1K-ΔSL1 (VP3-R<sub>56</sub>) en cultivo celular y su inocuidad en ratón lactante (apartados 5.3 y 5.4). Igualmente, también se ha comprobado que los transcritos de RNA derivados de las construcciones que portan la delección total o parcial de la 3'NCR con histidina en la posición 56 de VP3, entre los cuales se encuentra el genotipo O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>), no son infecciosos en cultivo celular.

Para analizar la contribución de la histidina en posición 56 de VP3 a la viabilidad del RNA O1K *in vivo*, se ensayó en ratón lactante la infectividad de los transcritos derivados de las construcciones pO1K, O1K-ΔSL1, -ΔSL2 y -Δ3'NCR, en versión VP3-H<sub>56</sub>. Los resultados de estos ensayos indican que ninguno de los transcritos inoculados en ratón lactante (entre 100 ng y 400 μg) fue infeccioso (Tabla 7).

Sorprendentemente, el transcrito de RNA O1K (VP3-H<sub>56</sub>) no fue capaz de causar la muerte en ratón lactante, incluso a dosis elevadas (100 μg). Sin embargo, la inoculación del sobrenadante de infección de O1K (VP3-H<sub>56</sub>), obtenido tras una transfección y un pase en cultivo celular, sí fue letal para algunos animales inoculados, en función de la dilución utilizada. El título calculado en ratón para virus O1K (VP3-H<sub>56</sub>) fue de  $4 \times 10^6$  LD<sub>50</sub>/ml (Tabla 7), mientras que el virus homólogo con arginina en VP3-56, O1K (VP3-R<sub>56</sub>), alcanzó un título de  $1 \times 10^3$  LD<sub>50</sub>/ml (Baranowski *et al.*, 2003), tres log inferior, utilizando como inóculo preparaciones de ambos virus con títulos equivalentes en cultivo celular ( $5 - 7 \times 10^7$  PFU/ml).

**Tabla 7. Infectividad en ratón lactante del RNA generado a partir de los clones O1K y sus derivados de delección en la 3'NCR en versión VP3-H<sub>56</sub><sup>a</sup>**

Dosis de RNA	O1K (VP3-H <sub>56</sub> )*	O1K-ΔSL1 (VP3-H <sub>56</sub> )	O1K-ΔSL2 (VP3-H <sub>56</sub> )	O1K-Δ3'NCR (VP3-H <sub>56</sub> )
400 µg	-	0/2	-	-
100 µg	0/3	0/2	0/5	0/4
50 µg	0/2	0/2	0/5	0/2
20 µg	-	-	-	0/2
10 µg	0/5	0/2	0/4	-
5 µg	-	0/2	-	-
4 µg	0/2	-	-	-
1 µg	0/10	0/5	-	-
500 ng	0/6	0/4	-	-
200 ng	0/5	0/2	-	-
100 ng	0/8	0/2	-	-

<sup>a</sup>Animales muertos/ inoculados para cada tipo y dosis de RNA.

-, no ensayado.

\*El título en ratón lactante del sobrenadante de infección de O1K (VP3-H<sub>56</sub>), obtenido tras una transfección y un pase en BHK-21, fue de  $4 \times 10^6$  DL<sub>50</sub>/ml.

Estos resultados indican que, aunque los virus recuperados de transfección con O1K VP3-H<sub>56</sub> resultaron ser 1000 veces más infecciosos para ratón lactante que sus correspondientes virus homólogos en versión VP3-R<sub>56</sub>, la reversión a His del residuo de Arg en posición VP3-56 no fue suficiente para generar un RNA infeccioso “per se” en ratón lactante, al menos en el rango de RNA ensayado, sugiriendo la contribución de residuos adicionales a la atenuación del RNA O1K *in vivo*, pese a la relevancia descrita para la posición 56 de VP3 como determinante de atenuación en bovino (Jensen & Moore, 1993; Sa-Carvalho *et al.*, 1997)

### **5.6. Análisis de la capacidad inmunogénica del RNA de FMDV en ratón adulto y respuesta protectora frente a virus infeccioso**

La inoculación de ratón adulto con FMDV ha sido utilizada ampliamente en ensayos de inmunización en el desarrollo de vacunas frente a FMDV y como modelo animal para estudiar la respuesta inmune adaptativa (Barfoed *et al.*, 2006; Borca *et al.*, 1986; Borrego *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 1986; Kamstrup *et al.*, 2006; Piatti *et al.*,

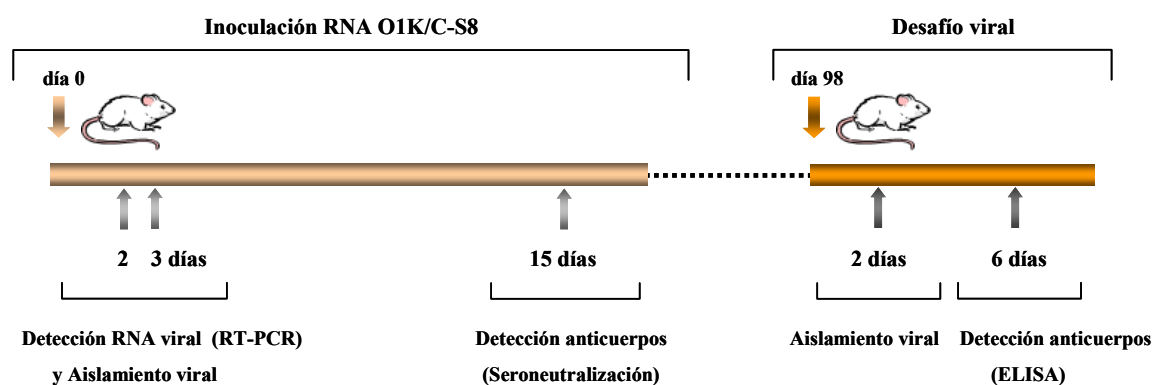
1991; Salguero *et al.*, 2005; Wigdorovitz *et al.*, 1999), como animal susceptible a la infección, generalmente subclínica, con aislados de FMDV capaces de replicar.

Como paso previo al ensayo de inmunización con transcritos de RNA infeccioso en un hospedador natural, se analizó la capacidad inmunogénica de un transcrito de RNA derivado de un clon infeccioso en ratón adulto.

### 5.6.1. Ensayos con el RNA O1K/C-S8

El RNA O1K/C-S8 se genera a partir del clon infeccioso quimérico pO1K/C-S8c1 (apartado 4.3.1.). La cápsida de O1K/C-S8 corresponde en su mayoría al aislado C-S8c1 insertada en el contexto de secuencia del aislado O1K. Los transcritos O1K/C-S8 tienen una infectividad específica de  $1,3 \times 10^3$  PFU/ $\mu$ g de RNA transfectado en células BHK-21. Inoculado como sobrenadante de virus, recuperado tras una transfección y dos pases en cultivo celular, es infeccioso en ratón lactante, alcanzando un título de  $1 \times 10^7$  DL<sub>50</sub>/ml para una preparación de  $10^7$  PFU/ml (Baranowski *et al.*, 2003).

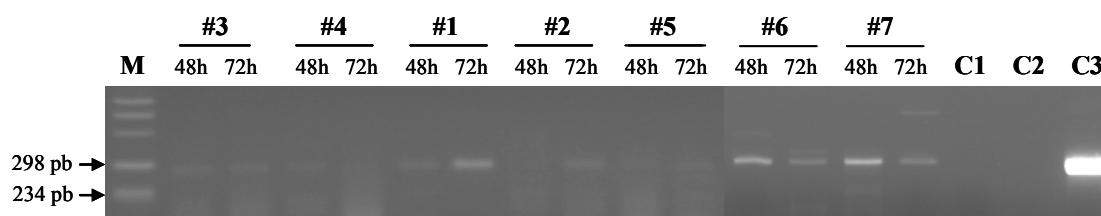
En el ensayo del RNA O1K/C-S8 en ratón adulto se emplearon un total de 19 animales de la cepa *Swiss* que fueron inoculados en el músculo tibial anterior con 10 ó 50  $\mu$ g de RNA. Posteriormente se analizó la presencia de anticuerpos específicos en suero y recuperación de virus en cultivo celular, mediante RT-PCR convencional con los cebadores A/B, ensayos de seroneutralización por reducción de placa o ELISA y ensayos de aislamiento viral, respectivamente (ver apartados 4.17, 4.20, 4.21 y 4.23).



**Figura 15. Diseño experimental del ensayo de inoculación en ratón adulto con RNA O1K/C-S8 y desafío viral.** Representación esquemática del experimento. Ratones *Swiss* fueron inoculados en el músculo tibial anterior con 10 y 50  $\mu$ g de RNA O1K/C-S8 y posterior desafío con  $10^3$  PFU de FMDV C-S8 en la almohadilla plantar. Las muestras de suero se tomaron a los días indicados con flechas grises para los correspondientes ensayos.

Las muestras de suero analizadas para viremia fueron las correspondientes a los días 2 y 3 p.i., las recogidas a día 15 p.i. para detectar anticuerpos por seroneutralización, las de día 6 p.d. para detectar anticuerpos por ELISA y las muestras recogidas a día 2 p.d. para aislar virus (Figura 15). Estos tiempos se seleccionaron acorde a lo descrito en (Borrego *et al.*, 2006).

Como resultado de estos análisis, en el 85% (16/19) de los animales inoculados con el transcrito O1K/C-S8 se pudo detectar la presencia de RNA viral en los sueros correspondiente a los días 2 y/o 3 p.i. (Tabla 8). En la Figura 16 se muestra un gel representativo de la detección por RT-PCR.



**Figura 16. Detección de RNA viral en muestras de suero de ratones inoculados con RNA O1K/C-S8.** Muestras representativas de la detección de RNA de FMDV en suero de 48 y 72 h p.i. de algunos ratones inoculados con RNA O1K/C-S8 (indicados con los números en la parte superior). La detección se realizó mediante RT-PCR empleando los cebadores A/B que amplifican un fragmento de 290 pb del gen 3Dpol (marcado con una flecha). **M.** Marcador de peso molecular VI de Roche. **C1.** Suero de ratón inoculado con PBS como control negativo. **C2.** Control negativo de RT-PCR con agua. **C3.** Suero de animal inoculado con FDMV como control positivo. Los productos de RT-PCR se analizaron en geles de agarosa al 2,5%.

A su vez, en el 58% (11/19) de los animales inoculados con RNA O1K/C-S8 se detectaron niveles significativos de anticuerpos neutralizantes específicos a día 15 p.i., tras analizar los porcentajes de reducción de placas de lisis en los ensayos de seroneutralización (Tabla 8). Igualmente se pudo comprobar que con la inoculación de una dosis mayor de RNA O1K/C-S8 no se logró incrementar la proporción de animales inmunizados. Así, el 70% de los animales (9/13) inoculados con 10 µg de RNA seroconvirtieron, mientras que sólo en el 33% de los animales (2/6) inoculados con 50 µg se indujeron niveles de anticuerpos neutralizantes detectables (Tabla 8). Sin embargo, para uno de los ratones inoculados con 50 µg de RNA, (ratón 14), se obtuvieron valores del 50% de reducción de placa con una dilución 1:250 de suero. Este

título es similar a los descritos en ratones vacunados o infectados experimentalmente (Borrego *et al.*, 2006).

**Tabla 8. Análisis de viremia, inmunización y protección frente a virus infeccioso en ratones adultos inoculados con RNA O1K/C-S8**

RNA	Animal	Detección RNA viral <sup>a</sup>		Aislamiento viral <sup>b</sup>	Actividad neutralizante <sup>c</sup>	Aislamiento viral p.d. <sup>b</sup>	Anticuerpos anti-FMDV p.d. <sup>d</sup>
		48 h p.i.	72 h p.i.				
O1K/C-S8 (10 µg)	1	+	+	-	25	6,0	+
	2	+	+	-	50	-	-
	3	+	+	-	55	6,0	+
	4	+	-	-	55	-	+
	5	+	+	-	63	-	+
	6	+	+	-	30	-	-
	7	+	+	-	50	-	-
	8	-	+	-	<1	6,0	+
	9	-	ND	-	40	6,0	+
	10	+	+	-	<1	6,0	+
	11	+	+	-	<1	>4,5	+
	12	+	-	-	<1	>4,0	+
	13	+	+	-	45	2,5	+
O1K/C-S8 (50 µg)	14	-	+	-	100*	-	+
	15	-	-	-	<1	>4,0	+
	16	ND	-	-	40	>3,5	+
	17	+	-	-	<1	6,0	+
	18	-	+	-	<1	6,0	+
	19	+	+	-	<1	-	-
O1K-Δ3'NCR (100 µg)	20-25	-	-	ND	<1	ND	ND

ND, no determinada.

El color amarillo indica animal protegido frente a la infección por FMDV.

<sup>a</sup>RNA viral detectado por RT-PCR en las muestras de suero de 2 y 3 días p.i. (apartado 4.17).

<sup>b</sup>Aislamiento viral realizado en IBRS-2 a partir de las muestras de suero de día 2 y 3 p.i. y día 2 p.d. La muestra se consideró negativa cuando no se recuperó virus tras dos pases seriados (apartado 4.20). La muestra positiva se expresó como el recíproco de la dilución de suero ( $\log_{10}$ ) en la que se observó CPE en el 50% de los pocillos (TCID<sub>50</sub>).

<sup>c</sup>Detección de anticuerpos neutralizantes mediante ensayos de reducción de placa de lisis a partir de muestras de suero de 15 días p.i. en la dilución 1:10 (apartado 4.23). El título de anticuerpos se expresó como el porcentaje de reducción en el número de placas de lisis promedio de dos o tres ensayos independientes.

\*Con el suero de este animal se obtuvo un 50% de reducción de placa con una dilución 1:250 de suero.

<sup>d</sup>Detección de anticuerpos específicos frente a proteínas estructurales de FMDV en las muestras de suero de día 6 p.d., mediante ELISA (apartado 4.21).

Por otro lado, también se realizaron ensayos de aislamiento de virus a partir de las muestras de suero tomadas a días 2 y 3 p.i. de todos los animales. En ningún caso se pudo aislar virus infeccioso, incluidas las muestras en las que se detectó RNA viral mediante RT-PCR. Este resultado sugiere que el bajo nivel de replicación del virus generado a partir del RNA inoculado no fue detectable por aislamiento viral, pero sí por una RT-PCR altamente sensible ( $10^{-2}$  PFU) (Saiz *et al.*, 2003).

El conjunto de estos resultados indica que hubo replicación suficiente para la expresión de proteínas virales en los animales inoculados con el transcrito O1K/C-S8, a diferencia de los animales inoculados con 100 µg de RNA O1K-Δ3'NCR (VP3-H56) sin capacidad replicativa en cultivo celular y en ratón lactante, en los que no se detectó viremia ni anticuerpos específicos (Tabla 8).

A continuación, una vez analizada la capacidad inmunogénica del transcrito O1K/C-S8, se evaluó la respuesta protectora inducida en los animales inoculados con este transcrito. Para ello, a los 98 días p.i. (ver Figura 15) se desafiaron con  $10^3$  PFU de virus C-S8, mediante inoculación en la almohadilla plantar.

Según el criterio establecido para determinar la respuesta protectora, basado en no aislar virus y detectar anticuerpos específicos a partir de las muestras de suero a días 2 y 6 p.d., respectivamente, tres de los animales inoculados con RNA O1K/C-S8 resultaron protegidos frente a la infección por FMDV. Estos ratones seroconvirtieron a consecuencia del desafío eficiente con virus, pero la replicación viral pudo contenerse y no se detectó viremia a día 2 p.d. Coherentemente, en esos 3 animales se habían detectado anticuerpos neutralizantes como consecuencia de la inoculación con RNA. Por tanto, de los 8 animales que pudieron considerarse efectivamente inmunizados por RNA y desafiados, pues la inoculación de virus falló en algunos casos (ELISA negativo a día 6 p.d) (Tabla 8), 3 resultaron protegidos frente a la infección por FMDV.

### ***5.6.2. Ensayos con el RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>)***

Una vez demostrada la capacidad del RNA O1K/C-S8 de replicar e inducir anticuerpos específicos en ratón adulto, pasamos a analizar la capacidad inmunogénica del RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>). El análisis de este genotipo era interesante debido a su incapacidad de replicar en cultivo celular y de infectar ratón lactante (ver apartados 5.3



y 5.4), de cara a la identificación y caracterización de nuevos posibles genotipos candidatos vacunales frente a fiebre aftosa.

Para ello, un grupo de 8 ratones adultos se inoculó con 100 µg de RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) y se analizó la viremia y la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a FMDV en las muestras de suero recogidas en los días 2, 3 y 15 p.i., respectivamente, mediante RT-PCR y seroneutralización como en el apartado anterior.

El análisis de la viremia indicó que en 6 de los 8 animales inoculados con el transcrito O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) se detectó la presencia de RNA viral a día 2 y 3 p.i. En 3 de esos 6 ratones el RNA viral fue detectado inicialmente a día 3 p.i. (Tabla 9). En ningún caso se pudo aislar virus en cultivo celular a día 2 ó 3 p.i.

**Tabla 9. Análisis de viremia y anticuerpos neutralizantes en ratones adultos inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>)**

RNA	Animal	Detección RNA viral <sup>a</sup>		Aislamiento viral <sup>b</sup>	Actividad neutralizante <sup>c</sup>
		48 h. p.i.	72 h. p.i.		
O1K-ΔSL1 (100 µg)	1	+	+	-	45
	2	+	+	-	50
	3	-	+	-	45
	4	-	+	-	50
	5	-	+	-	35
	6	+	+	-	35
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-

La detección de RNA viral, ensayos de aislamiento viral y detección de actividad neutralizante se determinaron como se indica en la Tabla 8.

<sup>a</sup>RNA viral detectado por RT-PCR en las muestras de suero de 2 y 3 días p.i.

<sup>b</sup>Aislamiento viral realizado en IBRS-2 con suero extraído a día 2 y 3 p.i.

<sup>c</sup>Detección de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero del día 15 p.i. mediante ensayos de seroneutralización. El título de anticuerpos se expresó como el porcentaje de reducción en el número de placas de lisis promedio de dos o tres ensayos independientes.

Por otro lado, la presencia de anticuerpos neutralizantes fue detectada a día 15 p.i. en todos los animales en los que se detectó viremia. Aunque en 4 de los 6 animales el porcentaje de reducción de placas observado a la dilución 1:10 de suero fue inferior al 50% (35 - 45%), en 2 de ellos fue similar a los observados en los ratones inoculados con el transcrito de RNA infeccioso O1K/C-S8 (comparar Tablas 8 y 9).

El conjunto de estos resultados indica que el transcrito de RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) fue capaz de replicar en ratón a nivel suficiente para inducir niveles detectables de anticuerpos específicos frente a FMDV.

### ***5.7. Ensayos de infectividad del RNA de FMDV en cerdo***

Con el objeto de valorar la viabilidad de posibles desarrollos vacunales basados en RNA para fiebre aftosa, y como paso previo al ensayo de genotipos defectivos en replicación potencialmente atenuados en hospedadores naturales, se determinó inicialmente la capacidad de inducir enfermedad por inoculación de RNA de FMDV generado por transcripción *in vitro* a partir de un clon infeccioso.

#### ***5.7.1. Inoculación de cerdos con transcritos de RNA O1K/C-S8***

El transcrito derivado del clon quimérico pO1K/C-S8c1 es infeccioso en ratón lactante con una DL<sub>50</sub> aproximada de 150 ng (Baranowski *et al.*, 2003). Además, hemos comprobado que este RNA es capaz de replicar e inducir títulos significativos de anticuerpos neutralizantes en ratón adulto (apartado 5.6.1). Para comprobar si este RNA era capaz de generar progenie viral infecciosa e inducir signos clínicos de la enfermedad en un hospedador natural, distintas cantidades de RNA O1K/C-S8 fueron ensayadas como inóculo en cerdo como se describe en el apartado 4.16.1. Así, tres animales fueron inoculados intradérmicamente en el rodete coronario con 150, 300 y 500 µg de RNA O1K/C-S8, respectivamente, y un cuarto animal se dejó como contacto sin inocular.

##### ***5.7.1.1. Seguimiento clínico de los animales inoculados***

Como se refleja en la Tabla 10, todos los animales inoculados con el transcrito de RNA O1K/C-S8, independientemente de la dosis, desarrollaron los signos clínicos típicos de la enfermedad: fiebre, lesiones vesiculares, ataxia, debilidad muscular, etc. entre los días 2 y 4 p.i. El número y el tamaño de las lesiones vesiculares (aftas) fueron indistinguibles de las desarrolladas por cerdos infectados experimentalmente con virus infeccioso. Igualmente, el animal contacto mantenido en el mismo “box”, también desarrolló los síntomas típicos de la enfermedad a los 7 días p.i.

La detección de RNA viral en muestras de suero, nódulos linfáticos, epitelio y líquido vesicular, recogidas entre los días 3 y 8 p.i. (Tabla 10) se realizó mediante RT-

PCR con los cebadores A/B (apartado 4.17). Además, a partir del líquido vesicular de una de las lesiones desarrolladas a día 4 p.i. en el animal inoculado con 500 µg de RNA se pudo aislar virus infeccioso en células IBRS-2 (apartado 4.20). La presencia de FMDV en esta muestra se confirmó, a su vez, mediante RT-PCR A/B y un ELISA basado en la detección de virus usando el anticuerpo monoclonal SD6 dirigido frente a la proteína de la cápsida VP1 (Mateu *et al.*, 1987).

**Tabla 10. Cerdos inoculados con RNA O1K/C-S8 desarrollaron la enfermedad y anticuerpos específicos frente al virus**

Animal	Dosis de RNA (µg)	Signos de enfermedad <sup>a</sup>	Detección de RNA viral por RT-PCR <sup>b</sup>	Título de anticuerpos neutralizantes <sup>g</sup>	Título de anticuerpos en ELISA <sup>h</sup>	
					α-virus tipo C	α-3ABC
1	150	3	3 <sup>c</sup>	>3.4 (22)	2.6 (22)	3.6 (22)
2	300	2	3 <sup>d</sup> , 4 <sup>c, e</sup>	1.7 (4)	ND	ND
3	500	4	4 <sup>f*</sup>	1.6 (4)	ND	2.2 (4)
Contacto	0	7	8 <sup>c, d, e</sup>	2.6 (8)	ND	ND

<sup>a</sup>Día p.i. en el que se observaron los primeros signos de la enfermedad (fiebre, lesiones vesiculares). Los animales se sacrificaron a distintos días p.i. (cerdo 1 a día 22, cerdo 2 a día 4 y los cerdos 3 y contacto a día 8 p.i.).

<sup>b</sup>Día p.i. en el que se recogieron las muestras positivas.

<sup>c</sup>Epitelio vesicular.

<sup>d</sup>Suero.

<sup>e</sup>Nódulos linfáticos.

<sup>f</sup>Líquido vesicular. \*Indica la muestra a partir de la que se aisló virus infeccioso en cultivo celular (apartado 4.20).

<sup>g</sup>Título expresado en PRN<sub>50</sub>. Entre paréntesis se indica el día p.i. en que se tomó la muestra de suero.

<sup>h</sup>Título expresado como el recíproco de la última dilución de suero (log<sub>10</sub>) cuyo valor de OD<sub>450</sub> fue superior al del correspondiente suero control negativo. Entre paréntesis se indica el día p.i. en el que la muestra fue tomada.

ND, no determinado.

En conjunto, estos resultados demuestran la virulencia del transcrito O1K/C-S8, derivado de un clon infeccioso, en un hospedador natural. El RNA O1K/C-S8 fue capaz de replicar eficientemente en los cerdos inoculados, causando la enfermedad y generando progenie viral capaz, a su vez, de infectar al animal contacto que acabó desarrollando igualmente los signos típicos de la enfermedad. En ambos casos, los signos clínicos fueron indistinguibles de los desarrollados por animales infectados experimentalmente o de forma natural (Alexandersen *et al.*, 2003a; Donaldson, 2004).

### ***5.7.1.2. Respuesta inmune inducida por la inoculación con RNA O1K/CS-8***

Para determinar los niveles de anticuerpos inducidos frente a FMDV en los cerdos inoculados con el RNA infeccioso O1K/C-S8, se realizaron ensayos de ELISA y seroneutralización (apartados 4.21 a 4.23), a partir de las muestras de suero tomadas entre los días 4 y 22 p.i. (Tabla 10).

En todos los animales inoculados con RNA, así como en el cerdo contacto, se detectaron títulos significativos de anticuerpos neutralizantes frente a FMDV. En el caso del cerdo 1, animal inoculado con la menor dosis de RNA, el título detectado en suero a día 22 p.i. (PRN<sub>50</sub> superior a 3) fue similar al inducido en animales vacunados con virus inactivado (Chinsangaram *et al.*, 1998b; McKenna *et al.*, 1995; Taboga *et al.*, 1997). A su vez, el análisis mediante ELISA también demostró la presencia de anticuerpos frente a proteínas estructurales de FMDV de serotipo C en el suero de este animal en el mismo día. Por otro lado, elevados niveles de anticuerpos frente a proteínas no estructurales (precursor 3ABC) del virus, también fueron detectados, como resultado de la replicación del virus (Tabla 10).

El conjunto de estos resultados demuestra la capacidad del transcrito de RNA derivado de un clon infeccioso de FMDV de estimular la respuesta inmune e inducir anticuerpos específicos frente al virus en un hospedador natural.

### ***5.7.2. Inoculación de cerdos con transcritos de RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>)***

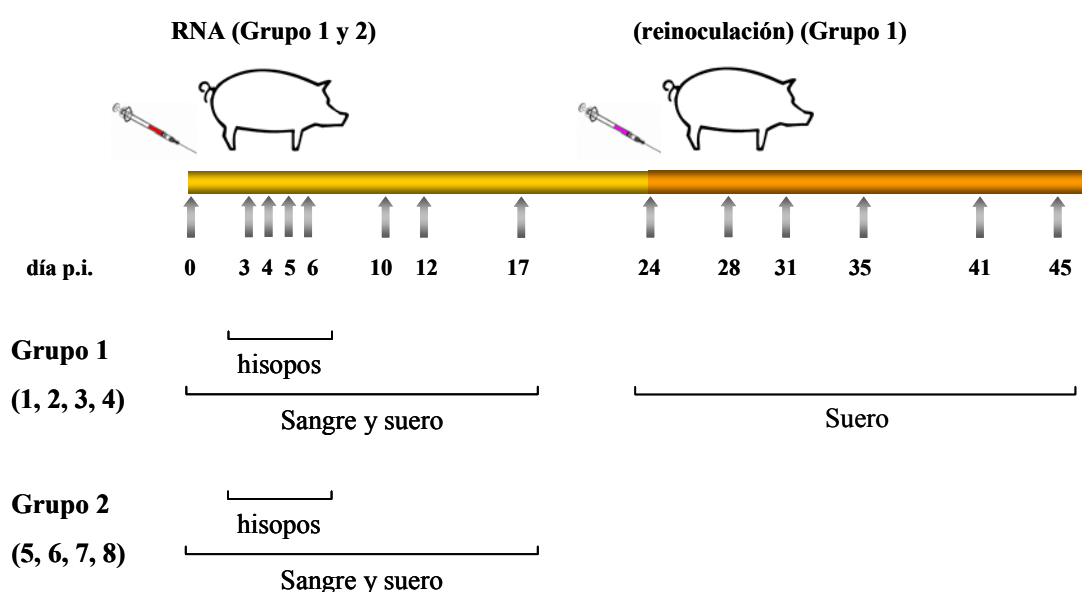
Demostrada la capacidad de inducir fiebre aftosa en cerdo mediante la inoculación de RNAs de FMDV sintetizados *in vitro* a partir de clones infecciosos, se ensayó la virulencia y capacidad inmunogénica de los transcritos O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>), defectivos en replicación en cultivo celular e inocuos para ratón lactante.

#### ***5.7.2.1. Diseño experimental y seguimiento clínico de los animales inoculados***

En la Figura 17 se muestra el esquema experimental del ensayo de inoculación con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdos. En este ensayo se emplearon 8 animales, en dos grupos de cuatro. El grupo 1 incluye a los cerdos 1 a 4, y el grupo 2 a los cerdos 5 a 8. Todos ellos se inocularon intradérmicamente en rodete coronario con una dosis de 500 µg de RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>), y a los 24 días tras esta inoculación, los

animales del grupo 1 recibieron una segunda inoculación de 500 µg. Las inoculaciones se realizaron como se describe en el apartado 4.16.1.

Durante los 41 días siguientes a la primera inoculación, se realizó un seguimiento clínico de los 8 animales para detectar cualquier signo de la enfermedad. Ninguno de los animales inoculados una o dos veces con el RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) desarrolló síntoma alguno de enfermedad. Los parámetros clínicos, tales como la temperatura rectal, apetito y consistencia fecal se mantuvieron dentro de la normalidad en un animal sano durante el transcurso del experimento.



**Figura 17. Diseño experimental del ensayo de inoculación de cerdos con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>).** Esquema representativo del ensayo y toma de muestras. Todos los animales se inocularon con 500 µg de RNA en el día 0 y con otros 500 µg de RNA (reinoculación) sólo el grupo 1 en el día 24 p.i. Las flechas indican los días p.i. en los que se analizaron muestras (hisopos, sangre y suero) para la detección de RNA viral y anticuerpos neutralizantes.

### 5.7.2.2. Análisis de viremia

Demostrada la inocuidad del RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo, el siguiente paso fue comprobar si el RNA inoculado en los animales había sido capaz de replicar y a qué nivel. Para ello se analizó la viremia en muestras de suero e hisopos nasales tomadas de todos los animales a distintos tiempos p.i. (Tabla 11). La detección de RNA viral se realizó mediante RT-PCR convencional con los cebadores A/B (apartado 4.17).

Como resultado de este análisis se pudo detectar RNA de FMDV en todas las muestras de suero a día 12 tras la primera inoculación, y en los cerdos 1, 2 y 8 a días más tempranos. Sin embargo, no se obtuvo amplificación a partir de ninguna de las muestras de hisopos nasales tomadas de los ocho animales entre los días 3 y 6 p.i. (Tabla 11). Tras la segunda inoculación, la viremia también fue analizada en las muestras de suero de los animales del grupo 1 (cerdos 1 a 4). En este caso, la presencia de RNA viral se detectó en las muestras de suero tomadas a los días 35 y 41 (día 11 y 17 tras la segunda inoculación) en los cerdos 4 y 1, respectivamente (Tabla 11).

Los resultados del análisis de la viremia indican que el RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) es capaz de replicar en cerdo de manera subclínica durante períodos de tiempo largos tras la inoculación, con un pico de viremia detectado entre los días 10-12, a diferencia de lo descrito en infecciones con FMDV, donde la viremia se detecta en una estrecha ventana de tiempo, normalmente entre los días 2 y 4 p.i. (Alexandersen *et al.*, 2003a; Donaldson, 2004).

**Tabla 11. Detección de RNA viral por RT-PCR en muestras de suero de cerdos inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>)<sup>a</sup>**

Animal	Días post-inoculación													
	0	3	4	5	6	10	12	17	24 <sup>b</sup>	28	31	35	41	45
1	-	+	-	-	+	+ <sup>c</sup>	+	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	+ <sup>c</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+ <sup>d</sup>		
5	-	-	-	-	-	-	+	-						-
6	-	-	-	-	-	-	+	-						-
7	-	-	-	-	-	-	+	-						-
8	-	-	+ <sup>c</sup>	-	-	-	+	-						-

<sup>a</sup>El sombreado indica los días en los que se tomaron las muestras de hisopos nasales. En ningún caso se detectó RNA viral en hisopos.

<sup>b</sup>Segunda inoculación con 500 µg de RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) a los animales del grupo 1.

<sup>c</sup>Muestras de suero empleadas para secuenciación.

<sup>d</sup>El cerdo 4 murió el día 35 p.i. durante la toma de muestras.

El hecho de no detectar RNA viral en hisopos nasales sugiere que el nivel de replicación del mutante probablemente no le permite alcanzar esa zona y replicar en ella, lo que es muy relevante para la transmisión de la enfermedad en cerdo.

Para valorar más exhaustivamente el nivel de replicación del virus O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo, se analizó la carga viral en suero mediante RT-PCR en tiempo real (apartado 4.18) para el animal 1 a día 10 tras la primera inoculación. La carga viral se determinó como  $1 \times 10^7$  genomas/ml de suero, alrededor de  $10^2$  veces menor que la descrita para sueros de animales infectados experimentalmente con virus de serotipo O (Alexandersen *et al.*, 2003a).

Por otro lado, para tratar de recuperar virus a partir de las muestras tomadas de los animales, se realizaron ensayos de aislamiento viral en células IBRS-2. Para ello se emplearon las muestras de sangre total, suero e hisopos nasales (apartado 4.16.4) de los días en los que se detectó RNA viral en suero por RT-PCR convencional hasta el día 10 (Tabla 11). En ningún caso se consiguió aislar virus en cultivo a partir de estas muestras.

Los resultados descritos en los apartados 5.7.2.1 y 5.7.2.2 demuestran que el mutante O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) está atenuado en cerdo.

#### **5.7.2.3. Análisis de secuencia**

Con el fin de analizar la estabilidad del genotipo O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo, la presencia de la delección del SL1 en los virus generados en los cerdos inoculados con el RNA mutante se comprobó mediante secuenciación. Igualmente, también se analizó la posición VP3-56 y la posible presencia de cambios en las regiones no estructurales 2C y 3C, en las que se detectaron sustituciones en virus O1K-ΔSL1 (VP3-R<sub>56</sub>) pasados en células BHK-21. Para ello, la 3'NCR completa, parte de la región VP3 y las regiones correspondientes a las proteínas 2C y 3C fueron amplificadas por RT-PCR. Debido al bajo número de copias de RNA viral en las muestras, la amplificación requirió dos ciclos de PCR acoplados tipo “nested” (apartado 4.19). Las muestras analizadas fueron los sueros tomados a día 10 p.i. de los cerdos 1 y 2, y del cerdo 8 a día 4 p.i. Mediante el análisis de la secuencia se confirmó la presencia de un residuo de histidina en la posición 56 de VP3 y la delección del SL1 en la 3'NCR, sin ningún cambio adicional en ella. Tampoco se detectó ninguna sustitución en las regiones 2C y 3C secuenciadas respecto a la secuencia parental O1K, apoyando los resultados obtenidos con el virus O1K-ΔSL1 (VP3-R<sub>56</sub>) pasado en la línea porcina

IBRS-2 (apartado 5.3.4). El conjunto de estos resultados confirma la estabilidad genética del mutante O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo.

### ***5.7.3. Estimulación de la respuesta inmune en cerdos inoculados con RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>)***

Comprobada la atenuación del virus O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo, dada la ausencia de signos clínicos y la incapacidad de aislar virus en cultivo celular a partir de distintas muestras, se analizó si la replicación detectada en todos los animales inoculados con RNA era capaz de inducir una respuesta inmune específica frente a FMDV. Para ello, tanto la respuesta a nivel humoral como celular fue estudiada para evaluar la capacidad inmunogénica del RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo.

#### ***5.7.3.1. Análisis de la respuesta humoral***

El análisis de la respuesta humoral consistió en el estudio de la inducción de anticuerpos específicos, neutralizantes y de isotipo IgA, en los animales inoculados con el RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>).

##### ***5.7.3.1.1. Detección de anticuerpos neutralizantes frente a FMDV***

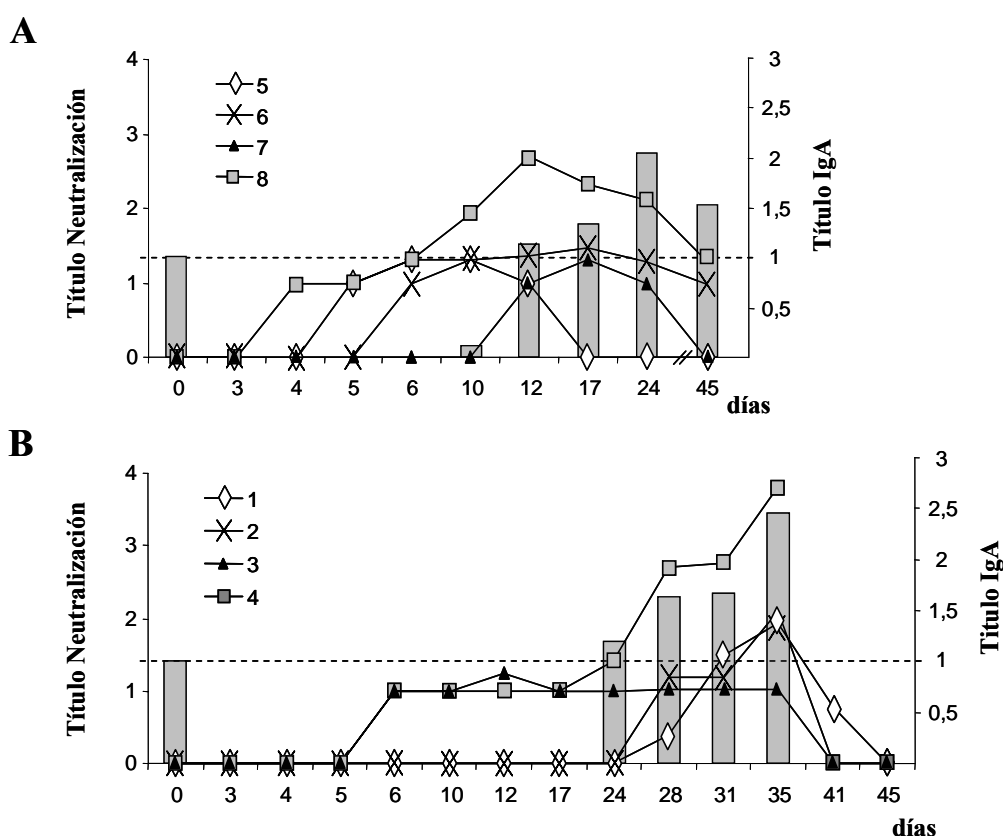
En primer lugar, y debido a su relevancia en la protección frente a la enfermedad, se analizaron los niveles de anticuerpos neutralizantes frente a FMDV presentes en las muestras de suero tomadas a distintos tiempos p.i. con el transcrito O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) mediante ensayos de seroneutralización por reducción de placa (apartado 4.23).

Como resultado de la primera inoculación con 500  $\mu$ g de RNA, el 75% de los animales (6/8) desarrollaron anticuerpos neutralizantes específicos frente al virus, y el 100% (8/8) tras la segunda inoculación de RNA.

Como se observa en la Figura 18, una única inoculación fue suficiente para inducir anticuerpos neutralizantes en todos los animales del grupo 2 (cerdos 5 a 8), y en la mitad del grupo 1 (cerdos 3 y 4). Como consecuencia de la segunda inoculación, los dos animales en los que no se habían detectado anticuerpos tras la primera también desarrollaron títulos significativos de anticuerpos neutralizantes. Los títulos en suero del cerdo 4 se incrementaron considerablemente tras la reinoculación (Figura 18). Los



títulos de anticuerpos neutralizantes detectados en el animal 8 a día 12 p.i. y en el animal 4 a día 35 (11 post-reinoculación), fueron elevados y equivalentes a los inducidos en animales inoculados con la vacuna convencional basada en virus inactivado (Chinsangaram *et al.*, 1998b; McKenna *et al.*, 1995; Taboga *et al.*, 1997).



**Figura 18. Inducción específica de anticuerpos neutralizantes e IgA en cerdos inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H56).** Representación del título de anticuerpos inducidos por los animales del grupo 2, inoculado con una dosis de RNA (A) y del grupo 1, inoculados por segunda vez con RNA el día 24 tras la primera inoculación (B). Los títulos de anticuerpos neutralizantes están expresados como PRN<sub>50</sub> a partir de ensayos de seroneutralización con los sueros correspondientes a los días indicados. Los niveles de IgA fueron determinados para los animales 8 y 4 mediante ELISA a partir de suero a los días indicados (gráficas A y B). El título de IgA fue expresado como la proporción entre los valores de DO del suero correspondiente a la dilución 1:50 respecto a su día 0.

#### 5.7.3.1.2. Detección de IgA

La inducción de anticuerpos IgA específicos en suero y mucosas ha sido correlacionada con protección en cerdos vacunados e infectados (Cubillos *et al.*, 2008;

Eble *et al.*, 2007). Por este motivo, la respuesta sistémica de IgA se analizó mediante ELISA específico de isotipo (ver apartado 4.21) en los cerdos 4 y 8, por ser los animales que desarrollaron mayores títulos de anticuerpos neutralizantes tras una o dos inoculaciones con RNA. En ambos animales se detectaron títulos por encima de 2 para una dilución 1:50. En el caso del cerdo 8, la respuesta IgA se detectó a día 24 y descendió a día 45 p.i. Para el cerdo 4, se detectó a día 35 (11 días post-reinoculación) (Figura 18). El título máximo de IgAs alcanzado fue equivalente al de un suero de un cerdo infectado experimentalmente con virus de serotipo O a día 15 p.i. (dato no mostrado).

Estos resultados demuestran la inducción de IgAs específicas en suero de animales inoculados con transcritos O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>).

### ***5.7.3.2. Análisis de la respuesta celular***

Para estudiar la respuesta inmune celular inducida por la inoculación del RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) se realizaron ensayos de linfoproliferación y de detección de IFN-γ a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

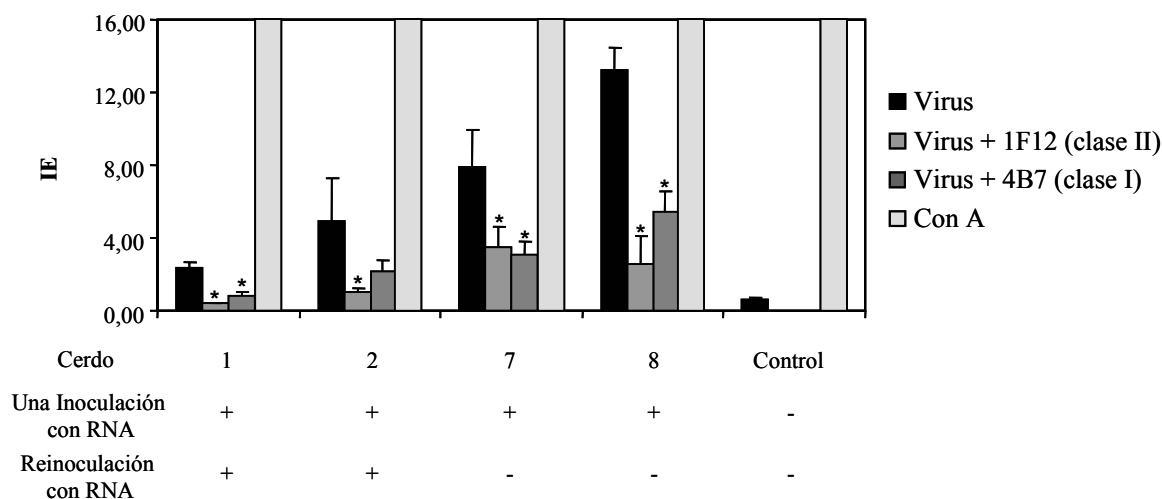
#### ***5.7.3.2.1. Respuesta linfoproliferativa***

Los ensayos de linfoproliferación se realizaron utilizando PBMC aisladas de sangre extraída a día 45 (día 21 post-reinoculación) (apartados 4.24 y 4.25) de los 7 animales disponibles a ese tiempo p.i., pues el cerdo 4 murió a día 35 p.i.

Los resultados obtenidos en estos ensayos indicaron que en 4 de los 7 animales analizados se estimuló la respuesta inmune celular. En la Figura 19 se representan los IE obtenidos en los ensayos de linfoproliferación correspondientes a los cerdos 1, 2, 7, 8 como animales inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en los que se detectó respuesta linfoproliferativa usando  $1,5 \times 10^5$  PFU (animales 1, 7 y 8) ó  $6,2 \times 10^5$  PFU (animal 2). Igualmente se muestra el IE para un animal control (apartado 4.25).

El hecho de no haber detectado estimulación significativa en PBMC del resto de los animales puede deberse a los periodos fluctuantes de la respuesta de linfocitos T que han sido descritos en cerdo y bovinos (Saiz *et al.*, 1992).

Los altos índices de estimulación (superiores a 21) obtenidos en todos los casos, tras estimulación inespecífica con ConA, indican que las PBMC mantuvieron inalterada la capacidad para proliferar tras 45 días p.i. con el RNA.



**Figura 19. Respuesta linfoproliferativa detectada en cerdos inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H56) a día 45 p.i. (día 21 post-reinoculación para los animales 1 y 2).** Los resultados se representan como el valor promedio de ensayos triplicados expresados como índices de estimulación (IE) usando  $1,5 \times 10^5$  PFU (animales 1, 7 y 8) ó  $6,2 \times 10^5$  PFU (animal 2). Igualmente se representan los valores obtenidos tras incubar las PBMC con anticuerpos monoclonales anti-MHC porcino (SLA) de clase I y II, (4B7 y 1F12), respectivamente, o con ConA. La barra de error indica la desviación estándar en cada caso y los asteriscos las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a las correspondientes células no tratadas.

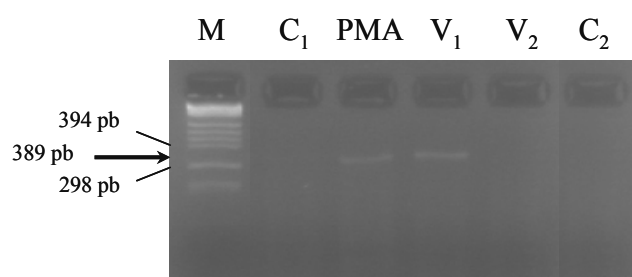
Por otro lado, la especificidad de la respuesta linfoproliferativa se confirmó incluyendo en los ensayos anticuerpos monoclonales específicos dirigidos frente a los complejos de histocompatibilidad porcino de clase I y II (SLA I y II). Estos anticuerpos fueron capaces de inhibir la estimulación entre el 56 y 83% (Figura 19), indicando que ambas rutas de presentación antigénica (clase I y II) están implicadas en la respuesta linfoproliferativa detectada. Estos resultados indican que la inoculación con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>), además de inducir una respuesta humoral, también es capaz de estimular la respuesta inmune celular en cerdo.

#### 5.7.3.2.2. Detección de IFN- $\gamma$

La citoquina IFN- $\gamma$  juega un importante papel en la regulación de la respuesta inmune celular y su estimulación es característica de la activación de los linfocitos T helper-1 (CD4+) en la respuesta inmune y adquiere una especial relevancia en el control

de la enfermedad (Boehm *et al.*, 1997). La relevante actividad antiviral del IFN- $\gamma$  frente a FMDV ha sido ampliamente documentada (Moraes *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2002). La detección de IFN- $\gamma$  a tiempos tempranos de la infección puede actuar como un indicador de la capacidad de estimular la inmunidad esterilizante en el hospedador (Barnett *et al.*, 2004). Por otro lado, la estimulación *in vitro* de IFN- $\gamma$  y el título de anticuerpos neutralizantes inducido en animales vacunados se han correlacionado con la capacidad para controlar la replicación viral tras el desafío (Parida *et al.*, 2006b). Por la importancia de esta citoquina en infección, se analizó si las PBMC obtenidas de los animales inoculados con el transcrito O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>), estimuladas con FMDV, eran capaces de inducir la expresión de IFN- $\gamma$ .

La producción de IFN- $\gamma$  en PBMC estimuladas se detectó inicialmente mediante ELISA y posteriormente mediante RT-PCR, a partir del sobrenadante y el RNA extraído de las PBMC de día 45 p.i., respectivamente, en un ensayo de estimulación *in vitro* con virus o PMA e ionomicina (ver apartado 4.25). La producción de IFN- $\gamma$  se analizó para los animales en los que se detectó una estimulación de la respuesta inmune celular (cerdos 1, 2, 7 y 8).



**Figura 20. Detección de IFN- $\gamma$  en PBMC de día 45 p.i. obtenidas del cerdo 8.** La amplificación del mRNA de IFN- $\gamma$  se realizó mediante RT-PCR a partir del RNA extraído de las PBMC (tomadas del animal 8 a día 45 p.i.) en ausencia de estímulo (C<sub>1</sub>), estimuladas con PMA e ionomicina (PMA), o estimuladas específicamente con  $6 \times 10^5$  PFU/ml (V<sub>1</sub>) ó  $4 \times 10^5$  PFU/ml (V<sub>2</sub>) de FMDV O1K (VP3-H<sub>56</sub>). El carril C<sub>2</sub> corresponde al control negativo con agua de la RT-PCR. M. Marcador de peso molecular VI (Roche). Los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa al 2,5%. El producto de amplificación esperado es de 389 pb.

Como resultado de este análisis, sólo en el animal que indujo la mejor respuesta humoral y celular (cerdo 8) se pudieron detectar niveles significativos, aunque bajos, de expresión de IFN- $\gamma$ , a partir del sobrenadante de los ensayos de linfoproliferación mediante ELISA (apartado 4.26). La citoquina se cuantificó en este animal en 15 pg/ml

y se determinó en una curva estándar realizada con un anticuerpo comercial anti-IFN- $\gamma$  en el rango de 4-500 pg/ml. Este bajo nivel de detección de IFN- $\gamma$  mediante ELISA pudo deberse al corto tiempo de incubación empleado para estimular las PBMC en el ensayo, necesitando posiblemente un mayor tiempo que las 24 h empleadas (Barnard *et al.*, 2005; de Groot *et al.*, 2005). Sin embargo, las condiciones ensayadas eran más idóneas para detectar esta citoquina como mRNA mediante RT-PCR, a partir del RNA extraído de las PBMC (Dozois *et al.*, 1997).

La Figura 20 muestra la detección de IFN- $\gamma$  a partir del RNA extraído de las PBMC del cerdo 8, estimuladas *in vitro* específicamente con 4 y 6,2 x 10<sup>5</sup> PFU/ml de O1K (VP3-H<sub>56</sub>) (apartado 4.25). La detección se realizó mediante amplificación de su mRNA por RT-PCR usando los cebadores específicos aei918 y aei019 (apartado 4.27). La especificidad de la estimulación se confirmó por la ausencia de amplificación del mensajero de esta citoquina en ausencia de estímulo específico (sólo medio de cultivo) y la funcionalidad de las células al amplificar IFN- $\gamma$  en presencia de estímulo inespecífico PMA (Figura 20).

La detección específica de IFN- $\gamma$  en ensayos de estimulación de las PBMC *in vitro* sugiere la capacidad del RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) para inducir IFN- $\gamma$  en los animales inoculados con este RNA.

### ***5.8. Ensayo de protección de los cerdos inoculados con RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) frente a desafío con virus infeccioso***

Demostrada la estimulación de la respuesta inmune humoral y celular en los animales inoculados con el transcrito O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>), se planteó su desafío con virus infeccioso con el objetivo de evaluar la capacidad protectora de la inoculación con este RNA. Para ello, los ocho animales inoculados con el transcrito O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) se desafiaron inoculando en rodete coronario 10<sup>4</sup> PFU del virus parental O1K (VP3-H<sub>56</sub>). Como animales control se incorporaron dos cerdos, uno en cada grupo de animales, que fueron igualmente inoculados. El virus empleado en el desafío fue un sobrenadante de infección con O1K (VP3-H<sub>56</sub>) obtenido tras una transfección y un único pase en cultivo celular, para preservar en la medida de lo posible la presencia de His en posición VP3-56 (Figura 11). El título de este sobrenadante de infección en ratón lactante se determinó previamente como 4 x 10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub>/ml (apartado 5.5.2).

## Resultados

Durante los 14 días posteriores al desafío se realizó un seguimiento clínico diario de los animales.

**Tabla 12. Análisis de la viremia en los cerdos inoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) tras el desafío con virus O1K (VP3-H<sub>56</sub>)**

	Animal	Días post-desafío						
		0	2	3	4	7	10	14
Grupo 1 <sup>a</sup>	1	-	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	+ <sup>d</sup>
Grupo 2 <sup>b</sup>	5	-	-	+ <sup>*</sup>	+ <sup>*</sup>	-	-	-
	6	-	-	-	+	+	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-
Control <sup>c</sup>	9	-	-	-	-	-	-	+ <sup>d</sup>
	10	-	-	-	-	-	-	+ <sup>d</sup>
		45	47	48	49	52	55	59
Días post-inoculación del RNA								

Los cerdos fueron desafiados mediante inoculación con 10<sup>4</sup> PFU de virus O1K (VP3-H<sub>56</sub>) en rodete coronario 45 días después de la primera inoculación con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>).

<sup>a</sup>Animales reinoculados con RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) 24 días después de la primera inoculación. El cerdo 4 murió 10 días antes del desafío. Los cerdos 2 y 1 murieron a día 0 y 10 p.d., respectivamente, durante la toma de muestras.

<sup>b</sup>Animales con una única inoculación de RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>).

<sup>c</sup>Animales control incorporados en el momento del desafío.

<sup>\*</sup>Manifestación de signos de enfermedad (fiebre y lesiones vesiculares).

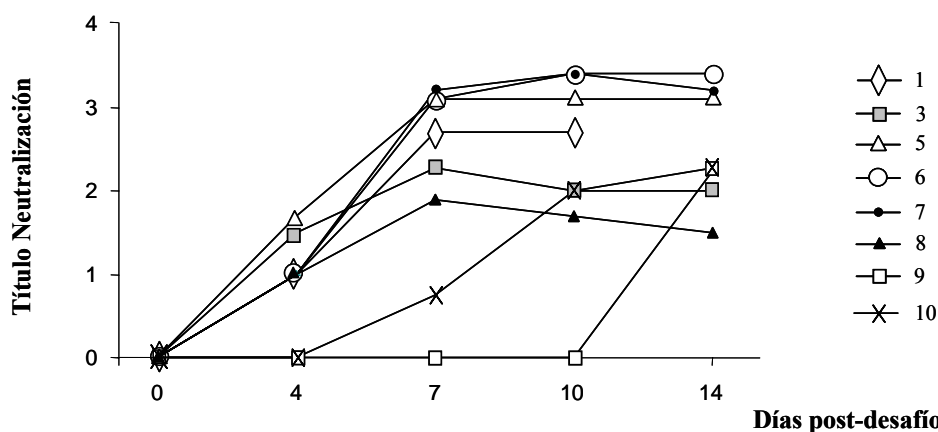
<sup>d</sup>Cuantificación de la carga viral en suero mediante RT-PCR en tiempo real: 1,6, 2,1 y 2,5 x 10<sup>8</sup> genomas/ml para los cerdos 3, 9 y 10, respectivamente.

Como resultado del desafío, sólo uno de los animales inoculados con el transcrito (cerdo 5) mostró signos de la enfermedad como hiperestesia, fiebre (41,7 °C), ataxia, etc. entre los días 3 y 9 p.d. y lesiones vesiculares a los 4 días p.d (Tabla 12). Coherentemente, este animal fue uno de los cerdos en los que la inoculación con RNA había inducido un título más bajo de anticuerpos neutralizantes antes del desafío (Figura 18, panel A). Sorprendentemente, ninguno de los dos cerdos control incorporados en el ensayo en el momento del desafío mostró signos clínicos de enfermedad durante los 14 días siguientes a la inoculación. Debido a la ausencia de síntomas de enfermedad en estos

animales control, se comprobó si el desafío había sido efectivo, y en su caso, intentar detectar diferencias entre los cerdos inoculados con RNA y los controles y establecer algún criterio de valoración de la respuesta protectora en los animales inmunizados con RNA. Para ello se analizó la viremia e inducción de anticuerpos neutralizantes en todos los animales.

El análisis de la viremia mediante RT-PCR convencional reveló la presencia de RNA viral en algunas muestras de suero de los cerdos 5 y 6 (grupo 2, con una única inoculación de RNA), entre los días 3 y 7 p.d., mientras que en suero del cerdo 3 (grupo 1, reinoculado con RNA) y de los dos animales control se detectó a día 14 p.d. (Tabla 12). La carga viral en suero también se analizó, mediante RT-PCR en tiempo real (apartado 4.18), en los cerdos 3, 9 y 10 a día 14 p.d. (Tabla 12). El número de genomas por ml en suero de estos animales osciló entre  $1,6\text{-}2,5 \times 10^8$  (Tabla 12), 10 veces superior al valor obtenido para el suero del cerdo 1 a día 10 p.i. con el RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>).

Cuando se analizaron los niveles de anticuerpos neutralizantes tras el desafío, se pudo comprobar que todos los animales inoculados con RNA indujeron anticuerpos neutralizantes más rápidamente que los cerdos control (Figura 21). Esta diferencia, de 4 ó 10 días, dependiendo del animal, indica que el sistema inmune de todos los cerdos inoculados con RNA había sido estimulado específicamente antes del desafío.



**Figura 21. Inducción de anticuerpos neutralizantes en cerdos inoculados con RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) tras el desafío con virus O1K (VP3-H<sub>56</sub>).** Representación de los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos en los animales inoculados con RNA una vez (cerdos 6, 7 y 8), dos veces (cerdos 1 y 3) y cerdos control (9 y 10) tras ser inoculados con  $10^4$  PFU de virus a día 45 p.i. Los títulos, expresados como PRN<sub>50</sub>, se determinaron mediante ensayos de seroneutralización a partir de los sueros correspondientes a los días p.d. indicados.

Por otro lado, a pesar de no detectarse viremia en los cerdos 1, 7 y 8 después del desafío (Tabla 12), la detección de anticuerpos neutralizantes a día 4 p.d., como en el resto de animales inoculados con RNA, y no a día 10 ó 14 p.d., como sucedió con los animales control (Figura 21), demostró que habían estado en contacto con el virus tras ser desafiados, sugiriendo que la replicación viral pudo ser bloqueada en estos animales, en los que se habían detectado previamente niveles significativos de anticuerpos neutralizantes como resultado de la primera o segunda inoculación con RNA, especialmente en el cerdo 8 (Figura 18).

En otros tres animales (cerdos 3, 5 y 6) la viremia en suero se detectó a distintos días p.d. (Tabla 12) y, aunque se detectó un perfil de anticuerpos neutralizantes similar al resto de animales inoculados con RNA tras el desafío (Figura 21), sólo uno de ellos (cerdo 5) desarrolló signos clínicos y lesiones vesiculares tras ser inoculado con virus infeccioso (Tabla 12). Precisamente, el animal que enfermó fue uno de los animales que menor título de anticuerpos neutralizantes indujo tras la inoculación con RNA, y en el que éstos disminuyeron antes en el tiempo, dejando de detectarse desde el día 17 p.i. (Figura 18, panel A).

Aunque en su conjunto los resultados obtenidos tras el desafío son prometedores, no se pudo valorar la respuesta protectora en los animales inoculados con RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) al no poder obtenerse conclusiones directas relacionadas con protección frente al desarrollo de la enfermedad mediante comparación con los animales control. Posiblemente la dosis de virus empleada para desafiar a los animales no fue suficiente para asegurar la inducción de signos clínicos, aunque no se puede descartar un cierto grado de atenuación en este virus, incluso después del cambio a His en VP3-56, como sugiere la inocuidad del RNA O1K (VP3-H<sub>56</sub>) en lactantes, pero en contradicción con el alto título obtenido de la preparación de virus en ratón. Determinar la capacidad protectora de la inoculación con RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo frente a la infección con FMDV requerirá la inoculación de las dosis infectivas adecuadas del virus de desafío, previamente titulado en ensayos adicionales en cerdo.











## **DISCUSIÓN**



## **6. DISCUSIÓN**

Esta tesis se ha centrado en la caracterización estructural y funcional de la región 3'-terminal del genoma de FMDV y la aplicación de la información obtenida al diseño de variantes atenuados con potencial vacunal mediante ensayos de inoculación con RNA. Estudios previos revelaron la esencialidad de la 3'NCR por su implicación funcional en los procesos de replicación y traducción del genoma (Lopez de Quinto *et al.*, 2002; Saiz *et al.*, 2001), haciendo de esta región una diana interesante para manipular su secuencia y alterar de manera controlada su funcionalidad en el ciclo infectivo de FMDV.

Utilizando sondas RNA correspondientes a los elementos estructurales presentes en los extremos 5' y 3' del RNA viral, se han identificado interacciones RNA-RNA entre la 3'NCR y las regiones S e IRES del extremo opuesto 5'. Además, se ha detectado la proteólisis de factores celulares con capacidad de unión a estas regiones durante la infección con FMDV en cultivo celular. Estos resultados inciden en la relevancia de la 3'NCR para el ciclo viral en la célula hospedadora.

Utilizando un clon infeccioso de FMDV que contiene la secuencia completa del aislado O1K, se han generado mutantes en la 3'NCR en los que los distintos dominios estructurales habían sido delecionados de forma individual. Esto ha permitido identificar al SL2 como esencial para la replicación del virus, pues su deleción resultó deletérea, mientras que la deleción del SL1 generó virus defectivos en replicación. Los ensayos de infectividad en cultivo celular, y de virulencia y capacidad inmunogénica en ratón y cerdo de los transcritos derivados de los distintos variantes han demostrado la capacidad de reproducir la enfermedad en un hospedador natural mediante inoculación de RNA generado a partir de un clon infeccioso y la atenuación del mutante  $\Delta$ SL1 en cerdo, capaz, no obstante, de inducir una respuesta inmune completa en los animales inoculados. Los resultados, en conjunto, demuestran la utilidad de los ensayos de virulencia basados en RNA, y la viabilidad de los diseños vacunales frente a fiebre aftosa basados en estrategias RNA.

### ***6.1. Interacciones RNA-RNA entre los extremos no codificantes del genoma de FMDV***

Las regiones NCRs localizadas en los extremos del RNA de FMDV contienen elementos altamente estructurados implicados en la regulación génica del genoma viral. En la 5'NCR, el IRES es la región responsable de la iniciación de la traducción cap-independiente del RNA viral (Martinez-Salas *et al.*, 2001), mientras que no hay información disponible sobre la funcionalidad del fragmento S, al que se atribuye un papel relevante en la replicación de FMDV por analogía con la estructura 5'-terminal "cloverleaf" de PV (Belsham, 2004). En el extremo opuesto del genoma, la 3'NCR, compuesta por dos estructuras tipo SL, es capaz de estimular la traducción IRES-dependiente incluso en ausencia del poli(A) (Lopez de Quinto *et al.*, 2002), lo que sugería la existencia de una conexión física funcional entre los extremos 5' y 3' del RNA viral.

Se han propuesto distintas estrategias para el establecimiento de contactos entre extremos 5' y 3' de virus RNA de polaridad positiva, incluyendo picornavirus, rotavirus y pestivirus, todas ellas implicando la participación de proteínas de unión a RNA (Herold & Andino, 2001; Isken *et al.*, 2007; Vende *et al.*, 2000). La circularización del genoma por interacciones directas a nivel RNA ha sido propuesta para flavivirus mediante secuencias complementarias (5' y 3' CS) localizadas en la región codificante de la cápsida y la 3'NCR (Corver *et al.*, 2003; Diviney *et al.*, 2008; Khromykh *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). La circularización del genoma del virus dengue en ausencia de proteínas ha sido demostrada mediante microscopia electrónica de fuerza atómica (Alvarez *et al.*, 2005).

Inicialmente se analizó la interacción a nivel de RNA entre transcritos correspondientes a los distintos elementos de las 5' y 3' NCRs. Como resultado de este análisis, se ha demostrado la interacción de la 3'NCR con dos regiones funcionalmente distintas de la 5'NCR (fragmento S e IRES). La interacción entre el fragmento S y la 3'NCR se mantuvo incluso cuando se utilizaron RNAs correspondientes a cada uno de los SLs por separado, aunque el patrón de interacción fue distinto entre ellos. Sin embargo, la interacción fue estrictamente dependiente de la estructura conformacional inducida por la presencia de la cola de poli(A).



Por otro lado, se ha comprobado que la interacción S-3'NCR ocurre de manera independiente a la interacción IRES-3'NCR, indicando que los residuos implicados en la interacción son distintos en ambos casos y que la 3'NCR no es capaz de interaccionar simultáneamente con los dos elementos reguladores de la 5'NCR en la misma molécula de RNA. Este resultado correlaciona con el hecho de que traducción y replicación tienen lugar de manera sucesiva, pero no simultánea sobre la misma molécula de RNA durante el ciclo infeccioso de picornavirus (Gamarnik & Andino, 1998; Novak & Kirkegaard, 1994).

La interacción de la 3'NCR con dos regiones independientes de la 5'NCR podría estar implicada en el control de la transición de traducción a replicación en los estadios tempranos del ciclo infectivo, según interaccionase la 3'NCR con el IRES o con el fragmento S, respectivamente (Martinez-Salas *et al.*, 2008).

La especificidad de las interacciones descritas para la 3'NCR de FMDV, demostrada por la falta de interacción cuando se utilizó la región equivalente de SVDV apoya su relevancia biológica. Resulta interesante destacar también que en un virus tan altamente variable como FMDV, su evolución haya sido influenciada por interacciones RNA-RNA intramoleculares, ya que la estructura secundaria de las regiones reguladoras analizadas está altamente conservada.

## **6.2. Interacción de proteínas celulares con los extremos 5' y 3' del RNA viral de FMDV**

La interacción de los extremos del genoma viral puede realizarse mediante puentes proteicos que aproximen las regiones 5' y 3', aunque la interacción de proteínas puede también contribuir a estabilizar las interacciones RNA-RNA entre los extremos.

En flavivirus, el factor de elongación 1- $\alpha$ , La o PTB son algunas de las proteínas que interaccionan con la 3'NCR (De Nova-Ocampo *et al.*, 2002). La interacción de proteínas pertenecientes a la familia NFAR con las 5' y 3' NCRs de pestivirus posiblemente juegue un papel regulador del ciclo viral (Isken *et al.*, 2007; Isken *et al.*, 2003). En el caso de los enterovirus, la interacción de la proteína celular PCBP1-2 o del precursor viral 3CD con el "cloverleaf" del extremo 5' del RNA viral estimula la traducción o replicación, respectivamente (Gamarnik & Andino, 1998; Toyoda *et al.*, 2007). Además, PCBP1-2 interacciona con la proteína PABP, asociada a la cola de

poli(A) del extremo 3' (Herold & Andino, 2001). Este conjunto de interacciones entre las proteínas y los elementos estructurales del RNA facilitaría la circularización del genoma de PV, permitiendo el inicio de la síntesis de la cadena negativa del RNA viral y la transición de traducción a replicación viral (Gamarnik & Andino, 1998; Herold & Andino, 2001).

Los patrones de interacción de proteínas celulares con la 3'NCR e IRES habían sido analizados previamente (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000; Lopez de Quinto *et al.*, 2002). La interacción específica de varios polipéptidos presentes en extractos celulares S10 de BHK-21 con la 3'NCR del genoma de FMDV había sido descrita. Sin embargo, no se disponía de información relativa a la interacción de proteínas con el fragmento S. Ensayos equivalentes de interacción de proteínas y la región correspondiente al fragmento S nos permitieron detectar la interacción específica de dos proteínas de aproximadamente 120 y 47 KDa (p120 y p47) con el fragmento S. Estas proteínas tienen una movilidad electroforética equivalente a dos de las tres proteínas que interaccionaban con la 3'NCR (p120, p70 y p47).

La p70 fue identificada de forma preliminar como la proteína PABP al observar su desaparición del patrón de interacción incubando la 3'NCR con la cola de poli(A) delecionada con extractos celulares S10 de BHK-21. Su identificación directa se realizó mediante su inmunoprecipitación utilizando un suero específico anti-PABP.

Dada la similitud entre las proteínas p120 y p47 que interaccionaban con el fragmento S y la 3'NCR nos planteamos, por un lado, analizar si se trataba de las mismas proteínas con una afinidad de unión común por ambos extremos del genoma viral, y por otro, tratar de determinar si se correspondían con algunas de las proteínas descritas que interaccionan con las NCRs de PV en el modelo de circularización y replicación general propuesto para virus de cadena sencilla y polaridad positiva (Herold & Andino, 2001). Mediante ensayos específicos sólo se pudo detectar competición entre los transcritos de RNA correspondientes al fragmento S y 3'NCR por la proteína de 47 KDa (p47), indicando que era capaz de interaccionar con ambas regiones. La falta de competición por p120 puede deberse a que se trate de distintas proteínas de tamaño similar que interaccionan con el fragmento S y la 3'NCR, o bien de un factor celular abundante cuya competición no sea detectable en los ensayos realizados. La similar movilidad electroforética de p47, similar a la de una proteína presente en los extractos

S10 reconocida por un suero específico frente a la proteína celular PCBP1-2, sugirió que se trataba de este factor celular que interacciona con el “cloverleaf” de PV y relacionado con regulación de los procesos de traducción y replicación (Gamarnik & Andino, 1997; 1998). La interacción de PCBP y PABP con elementos estructurales de los extremos 5' y 3' del RNA de FMDV apoya la teoría de la circularización del genoma en FMDV, que podría estar estabilizada por la formación de puentes proteicos de manera similar a lo propuesto para PV (Gamarnik & Andino, 1998; Herold & Andino, 2001).

### ***6.3. Interacción de las NCRs de FMDV con proteínas presentes en extractos de células infectadas***

Como se ha mencionado con anterioridad, las NCRs de FMDV contienen distintos elementos estructurales que son esenciales en el ciclo infeccioso del virus. Estos elementos estructurales son reconocidos por distintas proteínas virales y celulares que permiten controlar la traducción, replicación y la interacción de los complejos de replicación con las estructuras de la célula hospedadora (Martinez-Salas *et al.*, 2008). No obstante, durante el transcurso de la infección viral algunas de estas proteínas celulares se proteolizan como consecuencia de la actividad de las proteasas virales, originando la inhibición de la traducción cap-dependiente (“shutoff” traduccional) en detrimento de las proteínas celulares y favoreciendo la expresión de las proteínas virales (Sarnow, 2003). En el caso de FMDV, la proteasa Lb es la principal responsable de este fenómeno, debido a la proteólisis del factor de traducción eIF4G (Belsham *et al.*, 2000; Kirchweiger *et al.*, 1994; Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000), generando un fragmento C-terminal necesario para la actividad del IRES (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000). La proteasa 3C, además de realizar la mayor parte del procesamiento de la poliproteína viral (Grubman *et al.*, 1984; Robertson *et al.*, 1985), también es capaz de cortar eIF4G, eIF4A (Belsham *et al.*, 2000) y la histona H3 (Falk *et al.*, 1990).

Dada la importancia de la proteólisis de factores celulares durante la infección, se trató de analizar posibles cambios en los patrones de interacción de proteínas con las NCRs de FMDV durante el transcurso de la infección viral. Para ello, las sondas RNA correspondientes a los elementos estructurales de las 5' y 3' NCRs del genoma de

FMDV se incubaron con las proteínas presentes en los extractos citoplásmicos S10 de células infectadas por el virus, observándose que las proteínas p47, p70 y p116, que interaccionaban con el fragmento S y/o la 3'NCR, se proteolizaron total o parcialmente durante la infección, con variación del grado de procesamiento según el aislado viral empleado (O1K o C-S8). El procesamiento de p116 originó tres nuevos polipéptidos, p107, p96 y p90, capaces de interaccionar con las sondas S y 3'NCR. Una proteína de movilidad equivalente a p116 ha sido identificada como eIF3b y hemos comprobado que sufre procesamiento proteolítico durante la infección con FMDV. La posible implicación de las nuevas proteínas generadas en la estimulación o represión de la replicación o traducción viral requerirá estudios adicionales.

La interacción de la proteína p47 con el fragmento S y la 3'NCR disminuyó considerablemente cuando se emplearon células infectadas, de manera similar a lo observado para la proteína p70 (PABP) con la 3'NCR. El procesamiento parcial de PABP originó dos productos de menor peso molecular (p60 y p50). La detección de p60 en los extractos S10 citoplásmicos obtenidos a partir de células transfectadas con un plásmido que expresa la proteasa viral Lb, empleando un suero anti-PABP, indicó que Lb fue responsable del procesamiento de PABP, al menos parcialmente. Posiblemente la proteasa viral 3C, presente en los extractos S10, contribuya también a la proteólisis de todos o alguno de los factores identificados en este estudio. El procesamiento parcial de PABP ha sido descrito para otros picornavirus con implicación de 3C (Back *et al.*, 2002; Kerekatte *et al.*, 1999). La estimulación de la traducción cap-dependiente mediada por el poli(A) se debe a la interacción de PABP con eIF4G (Gebauer & Hentze, 2004). La rotura de PABP ejerce, por tanto, un efector inhibidor de la traducción de los mensajeros celulares (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito en PV que también puede ejercer un papel inhibidor de la traducción IRES-dependiente, posiblemente requerida para la transición de traducción a replicación durante el ciclo viral (Bonderoff *et al.*, 2008). De manera análoga, es posible que la proteólisis de PCBP (posiblemente p47), tenga un papel equivalente al estar implicada en la circularización del genoma y/o la regulación de la expresión génica en FMDV.

#### ***6.4. Caracterización funcional de los elementos estructurales de la 3'NCR y del mutante de delección O1K- $\Delta$ SL1***

Información previa sobre la esencialidad de la 3'NCR de FMDV y los resultados obtenidos en los estudios de interacción de este trabajo demuestran la relevancia de esta región en el control de la expresión génica del RNA viral, constituyendo una diana interesante para estrategias antivirales y manipulación dirigida al diseño de genotipos con potencial vacunal. A continuación, se planteó el análisis independiente de los dos dominios estructurales que componen la 3'NCR, los SLs 1 y 2.

La caracterización funcional de las estructuras que integran la 3'NCR se realizó sobre un clon infeccioso de FMDV, ensayando su infectividad inicialmente en cultivo celular mediante ensayos de transfección. Como resultado de estos ensayos se ha demostrado que, mientras el SL2 es esencial para la viabilidad del virus, la delección del SL1 permite recuperar virus infeccioso en cultivo celular.

Los virus generados a partir del mutante de delección O1K- $\Delta$ SL1 mostraron un retraso en la aparición de CPE de alrededor de 24 h y un fenotipo de placa pequeña, comparado con su homólogo de longitud completa (O1K), por lo que se estudió en detalle la cinética de crecimiento de un primer y quinto pase seriado en cultivo. Los títulos alcanzados por los virus progenie a distintos tiempos post-infección fueron consistentemente 10 veces inferiores a los del virus parental O1K, lo que sugería un defecto en replicación. La cuantificación de las moléculas de RNA viral de ambas polaridades en células transfectadas indicó que la delección del SL1 generaba virus con una menor capacidad replicativa, asociada a un defecto en la síntesis de RNA de cadena negativa, obteniéndose una diferencia de casi 300 veces con el RNA O1K a 16 h p.t.

En células infectadas con PV la cantidad de moléculas de cadena positiva es unas 40-70 veces mayor que su complementaria de polaridad negativa (Novak & Kirkegaard, 1991). A pesar de tratarse de células transfectadas con RNA, en células transfectadas con el transcrito de RNA O1K se pudo determinar una proporción dentro de este rango (44,4 veces) a 16 h p.t. Sin embargo, en células transfectadas con el mutante O1K- $\Delta$ SL1 esta proporción fue de 340 y 520 a 4 y 16 h p.t., respectivamente.

Es interesante destacar que las sondas RNA correspondientes al SL2, en los ensayos de interacción RNA-RNA, reproducían el patrón de interacción con el fragmento S de la 3'NCR completa, mientras que el SL1, pese a interaccionar, generaba

complejos adicionales de distinta movilidad. Correlacionar este resultado con las diferencias en viabilidad de los mutantes  $\Delta$ SL1 y  $\Delta$ SL2 requerirá experimentos adicionales.

Por otro lado, no se puede excluir la posibilidad de que el mutante O1K- $\Delta$ SL1 pudiera tener algún defecto en traducción. De hecho, la estimulación de la traducción IRES-dependiente ejercida por la 3'NCR puede no estar operando en este mutante, aunque el RNA O1K- $\Delta$ 3'NCR, derivado del clon infeccioso con los SL1 y SL2 delecionados es todavía capaz de traducir *in vitro* (Saiz *et al.*, 2001).

La estabilidad genética del mutante O1K- $\Delta$ SL1 también fue comprobada mediante la amplificación y secuenciación de todo el genoma viral en distintos pases realizados en cultivo celular. Así, la presencia de la deleción del SL1 en la 3'NCR, sin otros cambios adicionales en esta región, se confirmó tras 5 infecciones citolíticas seriadas. Este resultado demuestra que el virus O1K- $\Delta$ SL1 no es capaz de recuperar, de manera total o parcial, los 29 nt delecionados. El análisis del resto del genoma de estas mismas poblaciones virales O1K- $\Delta$ SL1 reveló la presencia de dos cambios en la región codificante, uno en la posición 90 de 2C y otra en la posición 63 de 3C. Estos cambios son fijados preferentemente en la línea BHK-21, mientras que no lo son en la línea porcina IBRS-2, derivada de un hospedador natural de FMDV.

En enterovirus se ha demostrado la dispensabilidad de la 3'NCR para la viabilidad viral, a diferencia de la cola de poli(A), necesaria para la eficiente traducción y replicación viral (Zoll *et al.*, 2009), sugiriendo que el mecanismo de inicio de la replicación en enterovirus no es específicamente dependiente de molde (Todd *et al.*, 1997). De hecho, es posible recuperar virus viables con deleciones completas en sus 3'NCRs y sin mutaciones compensatorias, mientras que deleciones parciales en los elementos estructurales dentro de ella parecen distorsionar interacciones intramoleculares de tipo terciario ("kissing") esenciales para la replicación, resultando generalmente en una pérdida de viabilidad (Brown *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 1997; van Ooij *et al.*, 2006). Para FMDV, como se ha comentado con anterioridad, toda la información disponible hasta la fecha sobre su 3'NCR indica que es esencial para iniciar la síntesis de RNA de cadena negativa manera eficiente.

Un trabajo reciente de mutagénesis mediada por transposón describe el aislamiento de un mutante viable de FMDV A24 con una inserción de 57 nt en la región

intermedia entre el SL1 y el SL2 que no perturba sus respectivas estructuras secundarias (Piccone *et al.*, 2009), respaldando las conclusiones obtenidas con el genotipo O1K-ΔSL1.

Como resultado de este trabajo, se ha demostrado que, dentro de la 3'NCR, el SL2 es el único estrictamente esencial para la replicación, mientras que el SL1 podría actuar como un estimulador del proceso. Estos resultados ponen de manifiesto diferencias significativas en el mecanismo de reconocimiento del RNA de FMDV por la maquinaria de replicación, respecto a lo descrito en enterovirus.

Un mutante de CVB3 con una delección del dominio Z, totalmente infeccioso en cultivo celular, resultó atenuado en ratón, demostrando la implicación de ese dominio en la replicación del virus *in vivo* (Merkle *et al.*, 2002). Esa región ha sido relacionada con tropismo celular mediante su interacción con el IRES (Dobrikova *et al.*, 2003). Por otro lado, mutantes de PV con una delección completa en la 3'NCR resultaron atenuados al ser inoculados en ratones transgénicos que expresan el receptor de PV (Brown *et al.*, 2004).

Tras comprobar el defecto en replicación del mutante O1K-ΔSL1, se ensayó inicialmente su infectividad en ratón lactante con el fin de valorar su grado de atenuación *in vivo* y su aplicación potencial como vacuna basada en RNA en hospedadores naturales de FMDV.

Previamente se había descrito que la inoculación intraperitoneal del transcrito de RNA derivado del clon infeccioso O1K era incapaz de causar enfermedad ni muerte en ratones lactantes, a diferencia del virus O1K recuperado de una transfección y pasado en cultivo celular, o del transcrito quimérico O1K/C-S8, letal a dosis bajas de RNA (Baranowski *et al.*, 2003). La inoculación de RNA O1K-ΔSL1 (hasta 100 μg), resultó inocua en ratón lactante. Su incapacidad de generar progenie infecciosa en los animales inoculados se confirmó en ensayos de transmisión de virulencia

Igualmente, la inocuidad en ratón lactante del mutante O1K-ΔSL1, inoculado como virus obtenido a partir de cultivo celular, confirmó su atenuación *in vivo*, a diferencia del virus parental O1K, letal en ratón lactante (Baranowski *et al.*, 2003). Estos resultados indican que el virus O1K-ΔSL1 está atenuado en ratón lactante.

### ***6.5. Capacidad inmunogénica del RNA de FMDV en ratón adulto y respuesta protectora frente a desafío con virus infeccioso***

Como se ha comentado anteriormente, el ratón no es un hospedador natural para FMDV. Sin embargo, el ratón adulto ha sido ampliamente utilizado como modelo animal en estudios de respuesta inmune y de desarrollo de vacunas frente a FMDV (Barfoed *et al.*, 2006; Borca *et al.*, 1986; Borrego *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 1986; Kamstrup *et al.*, 2006; Piatti *et al.*, 1991; Salguero *et al.*, 2005; Wigdorovitz *et al.*, 1999).

La detección de RNA viral a 48-72 h p.i. en suero de animales inoculados con un transcrito *in vitro* derivado del clon infeccioso pO1K/C-S8c1 y la detección de anticuerpos específicos frente al virus demostraron que la inoculación de RNA de FMDV era capaz de generar virus infeccioso y de estimular la respuesta inmune específica. Es destacable que uno de los animales inoculados con 50 µg indujo títulos de anticuerpos neutralizantes similares a los inducidos en ratones vacunados o infectados de forma experimental (Borrego *et al.*, 2006). Tras estos resultados, se consideró interesante analizar la capacidad del RNA para inducir una respuesta protectora frente a virus infeccioso en ratones. Así, tras inocular con virus infeccioso, mediante ensayos de aislamiento viral y detección de anticuerpos neutralizantes, se pudo determinar una eficiente respuesta protectora en 3 de los 8 ratones que habían desarrollado niveles de anticuerpos neutralizantes tras la inoculación con RNA O1K/C-S8 y en los que el desafío había sido efectivo. Este resultado demostraba la capacidad inmunogénica, potencialmente protectora, del RNA de FMDV en ratón adulto y avalaba el ensayo de su potencial infeccioso e inmunogénico en un hospedador natural.

### ***6.6. Infectividad del RNA de FMDV en cerdo***

Con el fin de comprobar si el RNA generado por transcripción *in vitro* a partir de clones infecciosos era capaz de inducir la enfermedad en cerdo, se inoculó un grupo de animales con RNA O1K/C-S8, capaz de inducir viremia y seroconversión en ratón adulto. La inoculación de cerdos con los transcritos de FMDV fue capaz de reproducir el patrón típico de la enfermedad. La excreción del virus generado en cerdo tras la inoculación y contagio de un animal contacto sin inocular, demostró la eficiente replicación del transcrito inoculado y su transmisión por vía natural hasta infectar a un



animal sano, que igualmente desarrolló la enfermedad. En ambos casos, los signos clínicos fueron indistinguibles de los desarrollados por animales infectados experimentalmente o de forma natural (Alexandersen *et al.*, 2003a; Donaldson, 2004).

Por otro lado, los niveles de anticuerpos neutralizantes detectados en todos los cerdos inoculados con el RNA O1K/C-S8, independientemente de la dosis inoculada, probaron la eficiente expresión de proteínas virales y estimulación de la inmunidad humoral. Resulta destacable que el título detectado en suero del animal inoculado con la menor de las dosis de RNA ( $PRN_{50} > 3$ ) fue equivalente a los títulos inducidos en animales vacunados con virus inactivado (Chinsangaram *et al.*, 1998b; McKenna *et al.*, 1995; Taboga *et al.*, 1997).

Estos resultados indican la utilidad de la inoculación de RNA transcrito *in vitro* a partir de clones infecciosos en cerdo para ensayar la virulencia de genotipos virales en un hospedador natural. La eficiente replicación y estimulación de la respuesta inmune demostrada en cerdo como consecuencia de la inoculación con transcritos de FMDV apoya la viabilidad de nuevos desarrollos vacunales basados en RNA como una posible estrategia para controlar la enfermedad en hospedadores naturales. La inoculación mediante “gene gun” de vacas y ovejas con transcritos de RNA de longitud completa derivados de un clon infeccioso de BVDV ha sido descrita como efectiva para inducir una respuesta humoral específica frente al virus (Vassilev *et al.*, 2001), sugiriendo que la inmunización de animales de interés ganadero a gran escala con RNA es técnicamente posible.

#### **6.7. Ensayos del RNA O1K- $\Delta$ SL1 en ratón**

Tras haber comprobado la capacidad del transcrito O1K/C-S8 de estimular la respuesta inmune humoral e inducir una respuesta protectora en ratón adulto, el siguiente paso fue ensayar la virulencia y capacidad inmunogénica del mutante O1K- $\Delta$ SL1, defectivo en replicación en cultivo celular e inocuo para ratones lactantes. Previamente, para intentar mejorar la capacidad infectiva del RNA O1K- $\Delta$ SL1 *in vivo*, se generó el mutante O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en el que se realizó la sustitución Arg→His en la posición 56 de VP3. La presencia de arginina en esa posición ha sido asociada con atenuación en bovino de aislados tipo O adaptados a cultivo celular (Jackson *et al.*, 1996; Jensen & Moore, 1993; Sa-Carvalho *et al.*, 1997).

El RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) perdió la capacidad infectiva en cultivo celular, incluso después de varios pases ciegos en cultivo. Igualmente, el RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) fue inocuo en ratón lactante, así como los RNA derivados de las construcciones O1K, O1K- $\Delta$ SL2 y O1K- $\Delta$ 3'NCR en su versión (VP3-H<sub>56</sub>). El hecho de que las construcciones en versión VP3-H<sub>56</sub> no fueran virulentas como RNA en lactantes sugiere que la sustitución en esa posición no es suficiente para ganar virulencia en ese modelo, por lo que la secuencia O1K debe incluir otros determinantes de atenuación adicionales.

La inoculación del RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en ratón adulto indujo una viremia detectable en el 75% de los animales inoculados, demostrando su capacidad replicativa *in vivo* a un nivel suficiente para estimular el sistema inmune y detectarse niveles de anticuerpos neutralizantes frente a FMDV en todos los ratones en los que se detectó viremia. Los títulos, menores que los detectados en ratones inoculados con el transcrito RNA O1K/C-S8, fueron significativos considerando que no se pudieron detectar anticuerpos específicos en ratones inoculados con el transcrito no replicante O1K- $\Delta$ 3'NCR.

### ***6.8. Ensayos en cerdo y potencial vacunal del RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>)***

Toda la información que se había obtenido de los ensayos *in vitro* e *in vivo* con el RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) sugería que podía ser un genotipo atenuado con potencial vacunal, por lo que se realizó un ensayo de inoculación y protección frente a virus infeccioso en una especie hospedadora natural del virus, el cerdo.

Una o dos inoculaciones con 500  $\mu$ g de RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) resultaron clínicamente inocuas para los cerdos inoculados, que no mostraron signo alguno de enfermedad. Tampoco se pudo aislar virus en cultivo celular a partir de las muestras de suero, aunque el RNA viral pudo ser amplificado mediante RT-PCR a tiempos tardíos p.i., consistente con un bajo nivel de replicación mantenido durante un período de tiempo largo p.i. La determinación de la carga viral en suero mediante RT-PCR a tiempo real indicó que en los animales inoculados con RNA era 1 log inferior a la descrita en cerdos inoculados con virus infeccioso de serotipo O de FMDV (Alexandersen *et al.*, 2003a). Estos resultados demuestran la atenuación del virus O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo.

Aunque el RNA de FMDV es detectable en hisopos nasales de animales infectados antes y después de la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad, e incluso en animales con infecciones subclínicas (Alexandersen *et al.*, 2003a), la incapacidad de detectar RNA viral a partir de hisopos nasales en los cerdos inoculados con RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) indica su incapacidad para alcanzar esa región, posiblemente por sus importantes defectos replicativos, reduciendo así su posibilidad de ser excretado y transmitir la infección.

La detección de anticuerpos neutralizantes en los animales inoculados excepto uno (el cerdo 1) tras la primera inoculación con RNA, y en todos los animales como resultado de la segunda inoculación, demostró la capacidad del RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) para inducir una respuesta humoral neutralizante en el hospedador natural, indicando que una única inoculación del RNA mutante puede ser suficiente para inducir títulos similares a los descritos para animales vacunados con virus inactivado (Chinsangaram *et al.*, 1998b; McKenna *et al.*, 1995; Taboga *et al.*, 1997).

La detección de anticuerpos IgA específicos en el suero de los animales que indujeron una mayor respuesta neutralizante tras la primera o segunda inoculación de RNA (animales 4 y 8) resulta relevante, pues la inducción de una respuesta IgA se ha asociado con protección y se ha sugerido que vacunas capaces de inducir una respuesta local de IgA pueden ser más efectivas (Cubillos *et al.*, 2008; Eble *et al.*, 2007; Francis & Black, 1983). La inducción de IgA en mucosas de los cerdos inoculados no pudo ser evaluada al no disponer de las muestras de hisopos a los tiempos p.i. adecuados.

Por otro lado, el transcrito de RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) fue capaz de inducir una respuesta inmune celular específica en 4 de los 8 animales inoculados con implicación de los SLA de clase I y II, indicando la capacidad del mutante O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) para estimular la respuesta celular CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La detección de IFN- $\gamma$  en PBMC del cerdo 8 estimuladas *in vitro* sugiere la capacidad de inducir esta citoquina, relevante en protección, en los cerdos inoculados con el RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>).

En su conjunto, los resultados obtenidos demostraron la capacidad del RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) para inducir una respuesta inmune completa, humoral y celular, que, por el título de anticuerpos neutralizantes inducidos en los animales inoculados, podría correlacionar con protección, como previamente ha sido descrito en cerdos (McCullough *et al.*, 1992; Sobrino *et al.*, 2001).

Para valorar el grado de protección de los cerdos inoculados con el RNA frente a la infección por FMDV, se inocularon los animales con  $10^4$  PFU del virus O1K (VP3-H<sub>56</sub>) generado de transfección y un pase en cultivo. La falta de síntomas de fiebre aftosa en los dos cerdos control de desafío hace que no se pueda concluir acerca de la protección frente a la enfermedad. Sin embargo, se observaron diferencias entre los animales inoculados con RNA y los controles. El único animal que enfermó fue uno de los cerdos con menor título de anticuerpos neutralizantes tras la inoculación con RNA y en el que éstos decayeron más rápidamente. Por otro lado, la inducción de anticuerpos neutralizantes p.d. en los dos animales control mostró un retraso de 4 y 10 días respecto a los cerdos inmunizados con RNA, indicando que habían estado en contacto con el virus y que su capacidad de respuesta fue más tardía. En dos de los cerdos inoculados con RNA no se detectó RNA viral en suero, pero sí respuesta de anticuerpos tras el desafío, lo que indica que fueron capaces de controlar la replicación del virus eficientemente. Para poder evaluar el nivel de protección conferido por la inoculación del RNA O1K-ΔSL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo habrá que realizar nuevos ensayos con una dosis de virus O1K (VP3-H<sub>56</sub>) adecuada para asegurar el desarrollo de la enfermedad en los animales control.

Las vacunas basadas en RNA representan una nueva y versátil estrategia frente a virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva para los que es posible generar RNA a partir de clones infecciosos, manipulables genéticamente. Como se ha mencionado en la Introducción, existen precedentes de ensayos de potenciales vacunas basadas en RNA frente a un picornavirus (CVB3) y flavivirus (TBVE) (Aberle *et al.*, 2005; Hunziker *et al.*, 2004; Kofler *et al.*, 2004; Mandl *et al.*, 1998a). La aplicación de esta tecnología a FMDV podría aportar ventajas frente a la actual vacuna convencional frente a fiebre aftosa basada en virus inactivado químicamente, como la seguridad y la posibilidad de generar vacunas “DIVA” que permitan diferenciar animales infectados de vacunados mediante la inserción de marcadores positivos y negativos.

El uso de vacunas vivas atenuadas conlleva el riesgo de reversión o posibilidad de recombinaciones que puedan generar virus patogénicos (King *et al.*, 1982; Lai, 1992). La delección de una región discreta del genoma resulta más segura en ese sentido que la incorporación de mutaciones puntuales, con mayor probabilidad de reversión. Un virus dengue tipo 4 recombinante portador de una delección de 30 nt en la 3'NCR es

inmunogénico en humanos y ha sido propuesto como vacuna viva atenuada frente al virus (Blaney *et al.*, 2006; Durbin *et al.*, 2001). La estabilidad de la delección del SL1 en la 3'NCR de la progenie viral O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) generada tras la transfección y 5 pases seriados en BHK-21 e IBRS-2, así como en la población viral circulante en los animales inoculados con el RNA O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) a día 10 p.i. fue comprobada mediante secuenciación. Estos resultados sugieren que la posibilidad de generación de un revertiente patogénico a partir del virus atenuado O1K- $\Delta$ SL1 (VP3-H<sub>56</sub>) en cerdo es muy improbable, aunque este aspecto requeriría ensayos más exhaustivos *in vivo*.

En nuestro grupo se continuarán los estudios de caracterización de las señales necesarias para la replicación y virulencia de FMDV en la 3'NCR y su interferencia dirigida a la generación de variantes atenuados con potencial vacunal.









## **CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

De este trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. La circularización del genoma de FMDV es posible a través de interacciones RNA-RNA entre elementos estructurales de sus respectivas NCRs 5' y 3'. Esta conexión puede ser estabilizada por interacciones de los extremos del RNA con proteínas celulares comunes posiblemente implicadas en la transición de traducción a replicación.
2. La infección por FMDV induce la proteólisis de factores celulares con capacidad de unión a las NCRs virales, sugiriendo un papel en la regulación de los procesos de traducción celular y viral.
3. El SL2 de la 3'NCR es esencial para la replicación de FMDV, mientras que el SL1 es dispensable, funcionando como un activador.
4. La delección del SL1 es estable y genera virus con menor capacidad de crecimiento en cultivo celular y un defecto en la síntesis de RNA de cadena negativa.
5. La inoculación de RNA de FMDV transcrito *in vitro* a partir de clones infecciosos genera virus capaz de replicar en ratón adulto e induce anticuerpos específicos frente al virus. Esta inmunización es capaz de conferir protección frente a desafío con virus infeccioso.
6. Es posible reproducir la fiebre aftosa en cerdo mediante inoculación de transcritos de RNA. El virus generado indujo anticuerpos específicos y pudo ser aislado en cultivo celular.
7. El genotipo O1K-ΔSL1 está atenuado en cerdo. Inoculado como RNA resultó inocuo pero capaz de inducir una respuesta inmune específica a nivel humoral y celular.
8. Los resultados obtenidos en el modelo de ratón y en cerdo, como hospedador natural, apoyan el potencial del genotipo O1K-ΔSL1 y de las estrategias basadas en RNA para el diseño de nuevas vacunas frente a fiebre aftosa.







## **BIBLIOGRAFÍA**





## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Aberle, J. H., Aberle, S. W., Kofler, R. M. & Mandl, C. W. (2005).** Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J Virol* **79**, 15107-15113.
- Abrams, C. C., King, A. M. & Belsham, G. J. (1995).** Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol* **76** ( Pt 12), 3089-3098.
- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. & Brown, F. (1989).** The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**, 709-716.
- Ahl, R. & Rump, A. (1976).** Assay of bovine interferons in cultures of the porcine cell line IB-RS-2. *Infect Immun* **14**, 603-606.
- Alexandersen, S. & Donaldson, A. I. (2002).** Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs. *Epidemiol Infect* **128**, 313-323.
- Alexandersen, S., Quan, M., Murphy, C., Knight, J. & Zhang, Z. (2003a).** Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J Comp Pathol* **129**, 268-282.
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. I. & Garland, A. J. (2003b).** The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* **129**, 1-36.
- Almeida, M. R., Rieder, E., Chinsangaram, J., Ward, G., Beard, C., Grubman, M. J. & Mason, P. W. (1998).** Construction and evaluation of an attenuated vaccine for foot-and-mouth disease: difficulty adapting the leader proteinase-deleted strategy to the serotype O1 virus. *Virus Res* **55**, 49-60.
- Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Luduena, S. J., Pietrasanta, L. I. & Gamarnik, A. V. (2005).** Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* **79**, 6631-6643.
- Amadori M, H. B., Moos A, Zerbini I. (2000).** IgA response of cattle to FMDV infection in probang and saliva samples. *EU FMD, Ras Gr, Borovets*, (Appendix 9): 88-106.
- Back, S. H., Kim, Y. K., Kim, W. J., Cho, S., Oh, H. R., Kim, J. E. & Jang, S. K. (2002).** Translation of polioviral mRNA is inhibited by cleavage of polypyrimidine tract-binding proteins executed by polioviral 3C(pro). *J Virol* **76**, 2529-2542.
- Bachrach H.L. (1977).** Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity,. in: *Romberger JA (Ed), Beltsville Symposia in Agricultural Research I Virology in Agriculture, Allanheld, Osmun, Montclair, NJ, 1977, pp 3-32.*
- Bachrach, H. L., Moore, D. M., McKercher, P. D. & Polatnick, J. (1975).** Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J Immunol* **115**, 1636-1641.
- Baer, B. W. & Kornberg, R. D. (1983).** The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* **96**, 717-721.
- Bahnemann, H. G. (1972).** The inactivation of foot-and-mouth disease virus by ethylenimine and propylenimine. *Zentralbl Veterinarmed B* **20**, 356-360.

- Bahnemann, H. G. (1975).** Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol* **47**, 47-56.
- Baranowski, E., Molina, N., Nunez, J. I., Sobrino, F. & Saiz, M. (2003).** Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. *J Virol* **77**, 11290-11295.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E. & Domingo, E. (2000).** Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* **74**, 1641-1647.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Beck, E. & Domingo, E. (1998).** Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**, 6362-6372.
- Barfoed, A. M., Rodriguez, F., Therrien, D., Borrego, B., Sobrino, F. & Kamstrup, S. (2006).** DNA immunization with 2C FMDV non-structural protein reveals the presence of an immunodominant CD8+, CTL epitope for Balb/c mice. *Antiviral Res* **72**, 178-189.
- Barnard, A. L., Arriens, A., Cox, S., Barnett, P., Kristensen, B., Summerfield, A. & McCullough, K. C. (2005).** Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine* **23**, 1037-1047.
- Barnes, D., Kunitomi, M., Vignuzzi, M., Saksela, K. & Andino, R. (2008).** Harnessing endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing attenuated virus vaccines. *Cell Host Microbe* **4**, 239-248.
- Barnett, P. V., Keel, P., Reid, S., Armstrong, R. M., Statham, R. J., Voyce, C., Aggarwal, N. & Cox, S. J. (2004).** Evidence that high potency foot-and-mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the "carrier" state in sheep. *Vaccine* **22**, 1221-1232.
- Barnett, P. V., Ouldrige, E. J., Rowlands, D. J., Brown, F. & Parry, N. R. (1989).** Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites. *J Gen Virol* **70** ( Pt 6), 1483-1491.
- Barteling, S. J. (2004).** *Modern inactivated Foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use*. Norfolk: Horizon Bioscience.
- Barteling, S. J. & Vreeswijk, J. (1991).** Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **9**, 75-88.
- Barteling, S. J. & Woortmeyer, R. (1987).** Multiple variants in foot-and-mouth disease virus (FMDV) populations: the Achilles heel for peptide and rec. DNA vaccines? *Dev Biol Stand* **66**, 511-521.
- Beard, C., Ward, G., Rieder, E., Chinsangaram, J., Grubman, M. J. & Mason, P. W. (1999).** Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J Biotechnol* **73**, 243-249.
- Beard, C. W. & Mason, P. W. (2000).** Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**, 987-991.
- Becker, Y. (1994).** Need for cellular and humoral immune responses in bovines to ensure protection from foot-and-mouth disease virus (FMDV)--a point of view. *Virus Genes* **8**, 199-214.

- Belsham, G. J. (1992).** Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *Embo J* **11**, 1105-1110.
- Belsham, G. J. (2005).** Translation and replication of FMDV RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**, 43-70.
- Belsham, G. J., Abrams, C. C., King, A. M., Roosien, J. & Vlak, J. M. (1991).** Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J Gen Virol* **72** ( Pt 3), 747-751.
- Belsham, G. J. & Bostock, C. J. (1988).** Studies on the infectivity of foot-and-mouth disease virus RNA using microinjection. *J Gen Virol* **69** ( Pt 2), 265-274.
- Belsham, G. J. & Brangwyn, J. K. (1990).** A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J Virol* **64**, 5389-5395.
- Belsham, G. J., Martinez-Salas, E. (2004).** Genome organisation, translation and replication of FMDV RNA. In *Foot-and-mouth disease: Current Perspectives*, pp. 19-52. Edited by F. Sobrino, Domingo, E. Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Belsham, G. J., McInerney, G. M. & Ross-Smith, N. (2000).** Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* **74**, 272-280.
- Bennink, J. R. & Palmore, T. N. (2004).** The promise of siRNAs for the treatment of influenza. *Trends Mol Med* **10**, 571-574.
- Benvenisti, L., Rogel, A., Kuznetsova, L., Bujanover, S., Becker, Y. & Stram, Y. (2001).** Gene gun-mediate DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **19**, 3885-3895.
- Bergamin, F., Saurer, L., Neuhaus, V., McCullough, K. C. & Summerfield, A. (2007).** Porcine B-cell activating factor promotes anti-FMDV antibodies in vitro but not in vivo after DNA vaccination of pigs. *Vet Immunol Immunopathol* **120**, 115-123.
- Bergamini, G., Preiss, T. & Hentze, M. W. (2000).** Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *Rna* **6**, 1781-1790.
- Berinstein, A., Tami, C., Taboga, O., Smitsaart, E. & Carrillo, E. (2000).** Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus. *Vaccine* **18**, 2231-2238.
- Bernstein, H. D., Sonenberg, N. & Baltimore, D. (1985).** Poliovirus mutant that does not selectively inhibit host cell protein synthesis. *Mol Cell Biol* **5**, 2913-2923.
- Bienz, K., Egger, D. & Pasamontes, L. (1987).** Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **160**, 220-226.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990).** Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**, 1156-1163.
- Bigeriego, P., Rosas, M. F., Zamora, E., Martinez-Salas, E. & Sobrino, F. (1999).** Heterotypic inhibition of foot-and-mouth disease virus infection by

- combinations of RNA transcripts corresponding to the 5' and 3' regions. *Antiviral Res* **44**, 133-141.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. (2005).** Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* **11**, 50-55.
- Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Lerner, R. A., Rowlands, D. J. & Brown, F. (1982).** Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**, 30-33.
- Blanco, E., Garcia-Briones, M., Sanz-Parra, A., Gomes, P., De Oliveira, E., Valero, M. L., Andreu, D., Ley, V. & Sobrino, F. (2001).** Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **75**, 3164-3174.
- Blanco, E., McCullough, K., Summerfield, A., Fiorini, J., Andreu, D., Chiva, C., Borrás, E., Barnett, P. & Sobrino, F. (2000).** Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4. *J Virol* **74**, 4902-4907.
- Blanco, E., Romero, L. J., El Harrach, M. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (2002).** Serological evidence of FMD subclinical infection in sheep population during the 1999 epidemic in Morocco. *Vet Microbiol* **85**, 13-21.
- Blaney, J. E., Jr., Durbin, A. P., Murphy, B. R. & Whitehead, S. S. (2006).** Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol* **19**, 10-32.
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. & Gilboa, E. (1996).** Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* **184**, 465-472.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. (1997).** Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**, 749-795.
- Bonderoff, J. M., Larey, J. L. & Lloyd, R. E. (2008).** Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C proteinase inhibits viral internal ribosome entry site-mediated translation. *J Virol* **82**, 9389-9399.
- Borca, M. V., Fernandez, F. M., Sadir, A. M., Braun, M. & Schudel, A. A. (1986).** Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* **59**, 261-267.
- Borrego, B., Fernandez-Pacheco, P., Ganges, L., Domenech, N., Fernandez-Borges, N., Sobrino, F. & Rodriguez, F. (2006).** DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses. *Vaccine* **24**, 3889-3899.
- Brown, D. M., Cornell, C. T., Tran, G. P., Nguyen, J. H. & Semler, B. L. (2005).** An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* **79**, 11962-11973.
- Brown, D. M., Kauder, S. E., Cornell, C. T., Jang, G. M., Racaniello, V. R. & Semler, B. L. (2004).** Cell-dependent role for the poliovirus 3' noncoding region in positive-strand RNA synthesis. *J Virol* **78**, 1344-1351.
- Brown, F. (1992).** New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine* **10**, 1022-1026.
- Brown F., N. J., Stott J., Porter A., Frisby D., Newton C., Carey N. and Fellner P., (1974).** Poly(C) in animal viral RNAs. *Nature* **251**, 342-344.

- Bullido, R., Domenech, N., Alvarez, B., Alonso, F., Babin, M., Ezquerra, A., Ortuno, E. & Dominguez, J. (1997).** Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and crossreactivity studies with leukocytes of domestic animals. *Dev Comp Immunol* **21**, 311-322.
- Bullido, R., Ezquerra, A., Alonso, F., Gómez del Moral, M., Domínguez, J. (1996).** Characterization of a new monoclonal antibody (4B7) specific for porcine MHC (SLA) class I antigens. *Investigación Agraria, Producción y Sanidad Animales* **11**, 29-37.
- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J. & Nieto, A. (2003).** PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**, 3263-3274.
- Cao, X., Bergmann, I. E., Fullkrug, R. & Beck, E. (1995).** Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **69**, 560-563.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2005).** Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**, 6487-6504.
- Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Oliveros, J. C., Zamorano, P. I., Sadir, A. M., Gomez, N., Salinas, J., Escribano, J. M. & Borca, M. V. (1998).** Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol* **72**, 1688-1690.
- Carroll, A. R., Rowlands, D. J. & Clarke, B. E. (1984).** The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* **12**, 2461-2472.
- Cedillo-Barron, L., Foster-Cuevas, M., Belsham, G. J., Lefevre, F. & Parkhouse, R. M. (2001).** Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *J Gen Virol* **82**, 1713-1724.
- Clarke, B. E., Brown, A. L., Currey, K. M., Newton, S. E., Rowlands, D. J. & Carroll, A. R. (1987).** Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* **15**, 7067-7079.
- Clarke, B. E., Sangar, D. V., Burroughs, J. N., Newton, S. E., Carroll, A. R. & Rowlands, D. J. (1985).** Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polypeptide in vivo. *J Gen Virol* **66** ( Pt 12), 2615-2626.
- Coetzer J. A. W., T. G. R., Tustin R. C. and Kriek N. P. J., (1994).** Foot-and-mouth disease. In: Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa. *J A W, Coetzer, G R, Thomsen, R C, Tustin and N P J, Kriek (Eds) Oxford University Press, Cape Town*, 825-852.
- Coleman, J. R., Papamichail, D., Skiena, S., Fitcher, B., Wimmer, E. & Mueller, S. (2008).** Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* **320**, 1784-1787.
- Collen, T. (1994).** Foot-and-mouth disease (aphthovirus): viral T cell epitopes. . In *Cell mediated immunity in ruminants*. Edited by B. M. L. G. a. I. Morrison. Boca Raton: CRC Press Inc.
- Collen, T., Dimarchi, R. & Doel, T. R. (1991).** A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J Immunol* **146**, 749-755.

- Collen, T. & Doel, T. R. (1990).** Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J Gen Virol* **71** ( Pt 2), 309-315.
- Collen, T., Pullen, L. & Doel, T. R. (1989).** T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J Gen Virol* **70** ( Pt 2), 395-403.
- Corver, J., Lenches, E., Smith, K., Robison, R. A., Sando, T., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (2003).** Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J Virol* **77**, 2265-2270.
- Crowther, J. R., Farias, S., Carpenter, W. C. & Samuel, A. R. (1993).** Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J Gen Virol* **74** ( Pt 8), 1547-1553.
- Cubillos, C., de la Torre, B. G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Barcena, J., Andreu, D., Sobrino, F. & Blanco, E. (2008).** Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J Virol* **82**, 7223-7230.
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., Rowlands, D. & Stuart, D. (1996).** Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* **4**, 135-145.
- Chatterjee, N. K., Bachrach, H. L. & Polatnick, J. (1976).** Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence of 3'-terminal polyribadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology* **69**, 369-377.
- Chen, W., Liu, M., Jiao, Y., Yan, W., Wei, X., Chen, J., Fei, L., Liu, Y., Zuo, X., Yang, F., Lu, Y. & Zheng, Z. (2006).** Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J Virol* **80**, 3559-3566.
- Chen, W., Yan, W., Du, Q., Fei, L., Liu, M., Ni, Z., Sheng, Z. & Zheng, Z. (2004).** RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J Virol* **78**, 6900-6907.
- Childerstone, A. J., Cedillo-Baron, L., Foster-Cuevas, M. & Parkhouse, R. M. (1999).** Demonstration of bovine CD8<sup>+</sup> T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* **80** ( Pt 3), 663-669.
- Chinsangaram, J., Beard, C., Mason, P. W., Zellner, M. K., Ward, G. & Grubman, M. J. (1998a).** Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J Virol* **72**, 4454-4457.
- Chinsangaram, J., Koster, M. & Grubman, M. J. (2001).** Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol* **75**, 5498-5503.
- Chinsangaram, J., Mason, P. W. & Grubman, M. J. (1998b).** Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **16**, 1516-1522.
- Chinsangaram, J., Moraes, M. P., Koster, M. & Grubman, M. J. (2003).** Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *J Virol* **77**, 1621-1625.

- Chinsangaram, J., Piccone, M. E. & Grubman, M. J. (1999).** Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *J Virol* **73**, 9891-9898.
- Dalsgaard, K., Uttenthal, A., Jones, T. D., Xu, F., Merryweather, A., Hamilton, W. D., Langeveld, J. P., Boshuizen, R. S., Kamstrup, S., Lomonossoff, G. P., Porta, C., Vela, C., Casal, J. I., Meloen, R. H. & Rodgers, P. B. (1997).** Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol* **15**, 248-252.
- de Castro, M. P. (1972).** Chromosome deletion and cell susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* **39**, 205-207.
- de Groot, J., Kruijt, L., Scholten, J. W., Boersma, W. J., Buist, W. G., Engel, B. & van Reenen, C. G. (2005).** Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs. *Immunology* **115**, 495-505.
- de la Torre, J. C., Martinez-Salas, E., Diez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Davila, M. & Domingo, E. (1988).** Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**, 2050-2058.
- de Los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R. & Grubman, M. J. (2006).** The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol* **80**, 1906-1914.
- De Nova-Ocampo, M., Villegas-Sepulveda, N. & del Angel, R. M. (2002).** Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* **295**, 337-347.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R. E., Ehrenfeld, E. & Grubman, M. J. (1988).** Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**, 4407-4409.
- Diez, J., Hofner, M., Domingo, E. & Donaldson, A. I. (1990).** Foot-and-mouth disease virus strains isolated from persistently infected cell cultures are attenuated for mice and cattle. *Virus Res* **18**, 3-7.
- DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T. & Mowat, N. (1986).** Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**, 639-641.
- Diviney, S., Tuplin, A., Struthers, M., Armstrong, V., Elliott, R. M., Simmonds, P. & Evans, D. J. (2008).** A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *J Virol* **82**, 9008-9022.
- Dobrikova, E., Florez, P., Bradrick, S. & Gromeier, M. (2003).** Activity of a type 1 picornavirus internal ribosomal entry site is determined by sequences within the 3' nontranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15125-15130.
- Doedens, J. R. & Kirkegaard, K. (1995).** Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* **14**, 894-907.
- Doel, T. R. (2003).** FMD vaccines. *Virus Res* **91**, 81-99.
- Domingo, E. (1989).** RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res* **33**, 93-133.

- Domingo, E., Davila, M. & Ortin, J. (1980).** Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**, 333-346.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Carrillo, E., Nunez, J. I. & Sobrino, F. (2003).** Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**, 47-63.
- Domingo, E., M. G. Mateu, M. A. Martínez, J. Dopazo, A. Moya, and F. Sobrino. (1990).** *Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus*. New York: Academic Press Inc., London.
- Domingo E., E. C., Menéndez-Arias L., Holland J.J., (2003).** Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. *Landes Bioscience, Austin, Texas*.
- Donaldson, A. (2004).** Clinical signs of foot-and-mouth disease. In *Foot-and-mouth disease: Current perspectives*, pp. 93-102. Edited by F. Sobrino, Domingo, E. Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Dozois, C. M., Oswald, E., Gautier, N., Serthelon, J. P., Fairbrother, J. M. & Oswald, I. P. (1997).** A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* **58**, 287-300.
- Dunn, C. S. & Donaldson, A. I. (1997).** Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec* **141**, 174-175.
- Duque, H. & Palmenberg, A. C. (2001).** Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region. *J Virol* **75**, 3111-3120.
- Durbin, A. P., Karron, R. A., Sun, W., Vaughn, D. W., Reynolds, M. J., Perreault, J. R., Thumar, B., Men, R., Lai, C. J., Elkins, W. R., Chanock, R. M., Murphy, B. R. & Whitehead, S. S. (2001).** Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *Am J Trop Med Hyg* **65**, 405-413.
- Dus Santos, M. J. & Wigdorovitz, A. (2005).** Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol Cell Biol* **83**, 229-238.
- Eble, P. L., Bouma, A., Weerdmeester, K., Stegeman, J. A. & Dekker, A. (2007).** Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine* **25**, 1043-1054.
- Eble, P. L., de Bruin, M. G., Bouma, A., van Hemert-Kluitenberg, F. & Dekker, A. (2006).** Comparison of immune responses after intra-typic heterologous and homologous vaccination against foot-and-mouth disease virus infection in pigs. *Vaccine* **24**, 1274-1281.
- Eigen, M. (1971).** Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.
- Eigen M., M. J., and Schuster P., (1988).** Molecular quasi-species. *J Phys Chem* **92**, 6881-6891.
- Escarmis, C., Toja, M., Medina, M. & Domingo, E. (1992).** Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**, 113-125.
- Falk, M. M., Grigera, P. R., Bergmann, I. E., Zibert, A., Multhaup, G. & Beck, E. (1990).** Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol* **64**, 748-756.



- Falk, M. M., Sobrino, F. & Beck, E. (1992). VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **66**, 2251-2260.
- Fenner F.J., G. P. J., Murphy R. Rott, Studdert M.J., White D.O. (1993). Veterinary virology. *Academic Press, New York, NY*, 403-430.
- Ferguson, N. M., Donnelly, C. A. & Anderson, R. M. (2001). The foot-and-mouth epidemic in Great Britain: pattern of spread and impact of interventions. *Science* **292**, 1155-1160.
- Fernandez-Miragall, O. & Martinez-Salas, E. (2003). Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *Rna* **9**, 1333-1344.
- Fernandez, F. M., Borca, M. V., Sadir, A. M., Fondevila, N., Mayo, J. & Schudel, A. A. (1986). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet Microbiol* **12**, 15-24.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2006). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *Embo J* **25**, 880-888.
- Ferris, N. P., King, D. P., Reid, S. M., Hutchings, G. H., Shaw, A. E., Paton, D. J., Goris, N., Haas, B., Hoffmann, B., Brocchi, E., Bugnetti, M., Dekker, A. & De Clercq, K. (2006). Foot-and-mouth disease virus: a first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol* **117**, 130-140.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E. & Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* **12**, 6587-6601.
- Fox, G., Parry, N. R., Barnett, P. V., McGinn, B., Rowlands, D. J. & Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* **70** ( Pt 3), 625-637.
- Francis, M. J. & Black, L. (1983). Antibody response in pig nasal fluid and serum following foot-and-mouth disease infection or vaccination. *J Hyg (Lond)* **91**, 329-334.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1997). Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *Rna* **3**, 882-892.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **12**, 2293-2304.
- Ganges, L., Barrera, M., Nunez, J. I., Blanco, I., Frias, M. T., Rodriguez, F. & Sobrino, F. (2005). A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine* **23**, 3741-3752.
- Garcia-Briones, M. M., Blanco, E., Chiva, C., Andreu, D., Ley, V. & Sobrino, F. (2004). Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology* **322**, 264-275.
- Garcia-Briones, M. M., Russell, G. C., Oliver, R. A., Tami, C., Taboga, O., Carrillo, E., Palma, E. L., Sobrino, F. & Glass, E. J. (2000). Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine* **19**, 1167-1171.

- Garcia-Valcarcel, M., Doel, T., Collen, T., Ryan, M. & Parkhouse, R. M. (1996).** Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *J Gen Virol* **77** ( Pt 4), 727-735.
- Gebauer, F., de la Torre, J. C., Gomes, I., Mateu, M. G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., de Mello, P. A. & Domingo, E. (1988).** Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol* **62**, 2041-2049.
- Gebauer, F. & Hentze, M. W. (2004).** Molecular mechanisms of translational control. *Nature reviews* **5**, 827-835.
- Gerber, K., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2001).** Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A(pro). *J Virol* **75**, 10979-10990.
- Gerner, W., Carr, B. V., Wiesmuller, K. H., Pfaff, E., Saalmuller, A. & Charleston, B. (2007).** Identification of a novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitope with immunodominant characteristics in cattle with MHC serotype A31. *Vet Res* **38**, 565-572.
- Gil, S., Spagnuolo-Weaver, M., Canals, A., Sepulveda, N., Oliveira, J., Aleixo, A., Allan, G., Leitao, A. & Martins, C. L. (2003).** Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Arch Virol* **148**, 2077-2097.
- Giles, J. (2001).** Farmers act to avert foot-and-mouth crisis. *Nature* **410**, 4.
- Giraud, A. T., Beck, E., Strebel, K., de Mello, P. A., La Torre, J. L., Scodeller, E. A. & Bergmann, I. E. (1990).** Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**, 780-783.
- Glass, E. J., Oliver, R. A., Collen, T., Doel, T. R., Dimarchi, R. & Spooner, R. L. (1991).** MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology* **74**, 594-599.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Richardson, A., Meredith, J., Almond, J. W., Barclay, W. & Evans, D. J. (2000).** Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol* **74**, 4590-4600.
- Grubman, M. J. (2005).** Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* **33**, 227-234.
- Grubman, M. J. & Baxt, B. (2004).** Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* **17**, 465-493.
- Grubman, M. J. & de los Santos, T. (2005).** Rapid control of foot-and-mouth disease outbreaks: is RNAi a possible solution? *Trends Immunol* **26**, 65-68.
- Grubman, M. J., Lewis, S. A. & Morgan, D. O. (1993).** Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* **11**, 825-829.
- Grubman, M. J., Moraes, M. P., Diaz-San Segundo, F., Pena, L. & de los Santos, T. (2008).** Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**, 8-17.
- Grubman, M. J., Morgan, D. O., Kendall, J. & Baxt, B. (1985).** Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells. *J Virol* **56**, 120-126.

- Grubman, M. J., Robertson, B. H., Morgan, D. O., Moore, D. M. & Dowbenko, D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **50**, 579-586.
- Guarne, A., Tormo, J., Kirchweger, R., Pfistermueller, D., Fita, I. & Skern, T. (1998). Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *Embo J* **17**, 7469-7479.
- Gutierrez-Rivas, M., Pulido, M. R., Baranowski, E., Sobrino, F. & Saiz, M. (2008). Tolerance to mutations in the foot-and-mouth disease virus integrin-binding RGD region is different in cultured cells and in vivo and depends on the capsid sequence context. *J Gen Virol* **89**, 2531-2539.
- Gutierrez, A., Rodriguez, A., Pintado, B. & Sobrino, F. (1993). Transient inhibition of foot-and-mouth disease virus infection of BHK-21 cells by antisense oligonucleotides directed against the second functional initiator AUG. *Antiviral Res* **22**, 1-13.
- Guttmann, N. & Baltimore, D. (1977). Morphogenesis of poliovirus. IV. existence of particles sedimenting at 150S and having the properties of provirion. *J Virol* **23**, 363-367.
- Guzman, E., Taylor, G., Charleston, B., Skinner, M. A. & Ellis, S. A. (2008). An MHC-restricted CD8+ T-cell response is induced in cattle by foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection and also following vaccination with inactivated FMDV. *J Gen Virol* **89**, 667-675.
- Haasnoot, P. C., Cupac, D. & Berkhout, B. (2003). Inhibition of virus replication by RNA interference. *J Biomed Sci* **10**, 607-616.
- Hannon, G. J. & Rossi, J. J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**, 371-378.
- Hansen, J. L., Long, A. M. & Schultz, S. C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**, 1109-1122.
- Harris, T. J. & Brown, F. (1977). Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* **34**, 87-105.
- Haydon, D. T., Bastos, A. D., Knowles, N. J. & Samuel, A. R. (2001). Evidence for positive selection in foot-and-mouth disease virus capsid genes from field isolates. *Genetics* **157**, 7-15.
- Herold, J. & Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**, 581-591.
- Herrera, M., Grande-Perez, A., Perales, C. & Domingo, E. (2008). Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J Gen Virol* **89**, 232-244.
- Hunziker, I. P., Harkins, S., Feuer, R., Cornell, C. T. & Whitton, J. L. (2004). Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge. *Virology* **330**, 196-208.
- Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C. W., Weinlich, S., Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A. & Behrens, S. E. (2007). Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *Rna* **13**, 1675-1692.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. N. & Behrens, S. E. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *Embo J* **22**, 5655-5665.

- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W. & King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **70**, 5282-5287.
- Jackson, T., King, A. M., Stuart, D. I. & Fry, E. (2003). Structure and receptor binding. *Virus Res* **91**, 33-46.
- Jensen, M. J. & Moore, D. M. (1993). Phenotypic and functional characterization of mouse attenuated and virulent variants of foot-and-mouth disease virus type O1 Campos. *Virology* **193**, 604-613.
- Jin, H., Xiao, W., Xiao, C., Yu, Y., Kang, Y., Du, X., Wei, X. & Wang, B. (2007). Protective immune responses against foot-and-mouth disease virus by vaccination with a DNA vaccine expressing virus-like particles. *Viral Immunol* **20**, 429-440.
- Kahana, R., Kuznetsova, L., Rogel, A., Shemesh, M., Hai, D., Yadin, H. & Stram, Y. (2004). Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by small interfering RNA. *J Gen Virol* **85**, 3213-3217.
- Kamstrup, S., Frimann, T. H. & Barfoed, A. M. (2006). Protection of Balb/c mice against infection with FMDV by immunostimulation with CpG oligonucleotides. *Antiviral Res* **72**, 42-48.
- Kerekatte, V., Keiper, B. D., Badorff, C., Cai, A., Knowlton, K. U. & Rhoads, R. E. (1999). Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol* **73**, 709-717.
- Khromykh, A. A., Meka, H., Guyatt, K. J. & Westaway, E. G. (2001). Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol* **75**, 6719-6728.
- Kim, S. M., Lee, K. N., Park, J. Y., Ko, Y. J., Joo, Y. S., Kim, H. S. & Park, J. H. (2008). Therapeutic application of RNA interference against foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.*
- King, A. M., McCahon, D., Slade, W. R. & Newman, J. W. (1982). Recombination in RNA. *Cell* **29**, 921-928.
- King, A. M., Sangar, D. V., Harris, T. J. & Brown, F. (1980). Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **34**, 627-634.
- Kirchweiger, R., Ziegler, E., Lamphear, B. J., Waters, D., Liebig, H. D., Sommergruber, W., Sobrino, F., Hohenadl, C., Blaas, D., Rhoads, R. E. & et al. (1994). Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol* **68**, 5677-5684.
- Kitching, R. P. (2002). Clinical variation in foot and mouth disease: cattle. *Rev Sci Tech* **21**, 499-504.
- Kitching, R. P. & Alexandersen, S. (2002). Clinical variation in foot and mouth disease: pigs. *Rev Sci Tech* **21**, 513-518.
- Kitching, R. P. & Hughes, G. J. (2002). Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. *Rev Sci Tech* **21**, 505-512.
- Kitson, J. D., McCahon, D. & Belsham, G. J. (1990). Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology* **179**, 26-34.

- Kleid, D. G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D. M., Grubman, M. J., McKercher, P. D., Morgan, D. O., Robertson, B. H. & Bachrach, H. L. (1981). Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* **214**, 1125-1129.
- Knowles, N. J. & Samuel, A. R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**, 65-80.
- Knowles, N. J., Samuel, A. R., Davies, P. R., Kitching, R. P. & Donaldson, A. I. (2001). Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet Rec* **148**, 258-259.
- Kofler, R. M., Aberle, J. H., Aberle, S. W., Allison, S. L., Heinz, F. X. & Mandl, C. W. (2004). Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1951-1956.
- Kuhn, R., Luz, N. & Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **64**, 4625-4631.
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 488-492.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Van Eden, M. E., Younan, P. & Lloyd, R. E. (2004). Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol* **24**, 1779-1790.
- Lai, M. M. (1992). Genetic recombination in RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 21-32.
- Lai, W. C. & Bennett, M. (1998). DNA vaccines. *Crit Rev Immunol* **18**, 449-484.
- Lama, J. & Carrasco, L. (1995). Mutations in the hydrophobic domain of poliovirus protein 3AB abrogate its permeabilizing activity. *FEBS Lett* **367**, 5-11.
- Laporte, J., Grosclaude, J., Wantyghem, J., Bernard, S. & Rouze, P. (1973). [Neutralization of the infective power of the foot-and-mouth disease virus in cell culture by using serums from pigs immunized with a purified viral protein]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **276**, 3399-3401.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J. & et al. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**, 123-139.
- Lee, C. C., MacKay, J. A., Frechet, J. M. & Szoka, F. C. (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* **23**, 1517-1526.
- Lewis, S. A., Morgan, D. O. & Grubman, M. J. (1991). Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J Virol* **65**, 6572-6580.
- Liu, M., Chen, W., Ni, Z., Yan, W., Fei, L., Jiao, Y., Zhang, J., Du, Q., Wei, X., Chen, J., Liu, Y. & Zheng, Z. (2005). Cross-inhibition to heterologous foot-and-mouth disease virus infection induced by RNA interference targeting the conserved regions of viral genome. *Virology* **336**, 51-59.
- Lobert, P. E., Escriou, N., Ruelle, J. & Michiels, T. (1999). A coding RNA sequence acts as a replication signal in cardioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11560-11565.
- Lopez de Quinto, S., Lafuente, E. & Martinez-Salas, E. (2001). IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *Rna* **7**, 1213-1226.

- Lopez de Quinto, S. & Martinez-Salas, E. (1997).** Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal ribosome entry site domain 3 are required for internal initiation of translation. *J Virol* **71**, 4171-4175.
- Lopez de Quinto, S. & Martinez-Salas, E. (2000).** Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *Rna* **6**, 1380-1392.
- Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F. & Martinez-Salas, E. (2002).** IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res* **30**, 4398-4405.
- Mandl, C. W. (2004).** Flavivirus immunization with capsid-deletion mutants: basics, benefits, and barriers. *Viral Immunol* **17**, 461-472.
- Mandl, C. W., Aberle, J. H., Aberle, S. W., Holzmann, H., Allison, S. L. & Heinz, F. X. (1998a).** In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. *Nat Med* **4**, 1438-1440.
- Mandl, C. W., Holzmann, H., Meixner, T., Rauscher, S., Stadler, P. F., Allison, S. L. & Heinz, F. X. (1998b).** Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J Virol* **72**, 2132-2140.
- Martinez-Salas, E. & Fernandez-Miragall, O. (2004).** Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr Pharm Des* **10**, 3757-3767.
- Martinez-Salas, E., Lopez de Quinto, S., Ramos, R. & Fernandez-Miragall, O. (2002).** IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**, 755-763.
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P. & Fernandez, N. (2008).** New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* **89**, 611-626.
- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. & Lopez de Quinto, S. (2001).** Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* **82**, 973-984.
- Martinon, F., Krishnan, S., Lenzen, G., Magne, R., Gomard, E., Guillet, J. G., Levy, J. P. & Meulien, P. (1993).** Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* **23**, 1719-1722.
- Mason, P. W., Bezborodova, S. V. & Henry, T. M. (2002).** Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**, 9686-9694.
- Mason, P. W., Grubman, M. J. & Baxt, B. (2003).** Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* **91**, 9-32.
- Mason, P. W., Piccone, M. E., McKenna, T. S., Chinsangaram, J. & Grubman, M. J. (1997).** Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* **227**, 96-102.
- Mateu, M. G., Camarero, J. A., Giralt, E., Andreu, D. & Domingo, E. (1995).** Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology* **206**, 298-306.
- Mateu, M. G., Martinez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. & Domingo, E. (1990).** A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71 ( Pt 3)**, 629-637.

- Mateu, M. G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedrosa, E., Giralt, E., Enjuanes, L. & Domingo, E. (1987).** Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **8**, 261-274.
- Mayr, G. A., Chinsangaram, J. & Grubman, M. J. (1999).** Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* **263**, 496-506.
- Mayr, G. A., O'Donnell, V., Chinsangaram, J., Mason, P. W. & Grubman, M. J. (2001).** Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine* **19**, 2152-2162.
- McCullough, K. C., De Simone, F., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J. R. & Kihm, U. (1992).** Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J Virol* **66**, 1835-1840.
- McKenna, T. S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B. & Mason, P. W. (1995).** Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* **69**, 5787-5790.
- McKnight, K. L. & Lemon, S. M. (1998).** The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *Rna* **4**, 1569-1584.
- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J. K. & Belsham, G. J. (1993).** The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* **194**, 355-359.
- Meister, G. & Tuschl, T. (2004).** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349.
- Melchers, W. J., Hoenderop, J. G., Bruins Slot, H. J., Pleij, C. W., Pilipenko, E. V., Agol, V. I. & Galama, J. M. (1997).** Kissing of the two predominant hairpin loops in the coxsackie B virus 3' untranslated region is the essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **71**, 686-696.
- Mello, C. C. & Conte, D., Jr. (2004).** Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**, 338-342.
- Merkle, I., van Ooij, M. J., van Kuppeveld, F. J., Glaudemans, D. H., Galama, J. M., Henke, A., Zell, R. & Melchers, W. J. (2002).** Biological significance of a human enterovirus B-specific RNA element in the 3' nontranslated region. *J Virol* **76**, 9900-9909.
- Meyer, L. J., Milburn, S. C. & Hershey, J. W. (1982).** Immunochemical characterization of mammalian protein synthesis initiation factors. *Biochemistry* **21**, 4206-4212.
- Mirmomeni, M. H., Hughes, P. J. & Stanway, G. (1997).** An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication. *J Virol* **71**, 2363-2370.
- Moraes, M. P., Chinsangaram, J., Brum, M. C. & Grubman, M. J. (2003).** Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. *Vaccine* **22**, 268-279.

- Moraes, M. P., de Los Santos, T., Koster, M., Turecek, T., Wang, H., Andreyev, V. G. & Grubman, M. J. (2007). Enhanced antiviral activity against foot-and-mouth disease virus by a combination of type I and II porcine interferons. *J Virol* **81**, 7124-7135.
- Moraes, M. P., Mayr, G. A., Mason, P. W. & Grubman, M. J. (2002). Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine* **20**, 1631-1639.
- Morse, M. A., Nair, S. K., Mosca, P. J., Hobeika, A. C., Clay, T. M., Deng, Y., Boczkowski, D., Proia, A., Neidzwiecki, D., Clavien, P. A., Hurwitz, H. I., Schlom, J., Gilboa, E. & Lyerly, H. K. (2003). Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest* **21**, 341-349.
- Mueller, S., Papamichail, D., Coleman, J. R., Skiena, S. & Wimmer, E. (2006). Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J Virol* **80**, 9687-9696.
- Muench, R. L. J. a. H. (1935). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493-497.
- Mulcahy, G., Gale, C., Robertson, P., Iyisan, S., DiMarchi, R. D. & Doel, T. R. (1990). Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **8**, 249-256.
- Mulcahy, G., Reid, E., Dimarchi, R. D., Gale, C. & Doel, T. R. (1992). Maturation of functional antibody affinity in animals immunised with synthetic foot-and-mouth disease virus. *Res Vet Sci* **52**, 133-140.
- Nargi, F., Kramer, E., Mezencio, J., Zamparo, J., Whetstone, C., Van Regenmortel, M. H., Briand, J. P., Muller, S. & Brown, F. (1999). Protection of swine from foot-and-mouth disease with one dose of an all-D retro peptide. *Vaccine* **17**, 2888-2893.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G. & Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* **79**, 7698-7706.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., Woolaway, K. E., Birtley, J., Curry, S. & Belsham, G. J. (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* **80**, 9865-9875.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P. W., Blystone, S. D., Brown, E. J. & Baxt, B. (1998). Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol* **72**, 3587-3594.
- Novak, J. E. & Kirkegaard, K. (1991). Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* **65**, 3384-3387.
- Novak, J. E. & Kirkegaard, K. (1994). Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes Dev* **8**, 1726-1737.
- Novina, C. D. & Sharp, P. A. (2004). The RNAi revolution. *Nature* **430**, 161-164.



- Nunez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sanchez, C., Domingo, E. & Sobrino, F. (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**, 3977-3983.
- Palmenberg, A. C. (1990). Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol* **44**, 603-623.
- Parida, S., Anderson, J., Cox, S. J., Barnett, P. V. & Paton, D. J. (2006a). Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. *Vaccine* **24**, 1107-1116.
- Parida, S., Fleming, L., Oh, Y., Mahapatra, M., Hamblin, P., Gloster, J., Doel, C., Gubbins, S. & Paton, D. J. (2007). Reduction of foot-and-mouth disease (FMD) virus load in nasal excretions, saliva and exhaled air of vaccinated pigs following direct contact challenge. *Vaccine* **25**, 7806-7817.
- Parida, S., Oh, Y., Reid, S. M., Cox, S. J., Statham, R. J., Mahapatra, M., Anderson, J., Barnett, P. V., Charleston, B. & Paton, D. J. (2006b). Interferon-gamma production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. *Vaccine* **24**, 964-969.
- Parsley, T. B., Towner, J. S., Blyn, L. B., Ehrenfeld, E. & Semler, B. L. (1997). Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *Rna* **3**, 1124-1134.
- Pascolo, S. (2004). Messenger RNA-based vaccines. *Expert Opin Biol Ther* **4**, 1285-1294.
- Pascolo, S. (2006). Vaccination with messenger RNA. *Methods Mol Med* **127**, 23-40.
- Paul A.V., R. E., Kim D.W., van Boom J.H. and Wimmer E., (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* **74**, 10359-10370.
- Paul, A. V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2003). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* **77**, 891-904.
- Pereira, H. G. (1976). Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Dev Biol Stand* **35**, 167-174.
- Pereira, H. G. (1981). *Foot-and-mouth disease*. London: Academic Press Inc.
- Pfaff, E., Mussgay, M., Bohm, H. O., Schulz, G. E. & Schaller, H. (1982). Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus. *Embo J* **1**, 869-874.
- Pfaff, E., Thiel, H. J., Beck, E., Strohmaier, K. & Schaller, H. (1988). Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **62**, 2033-2040.
- Pfister T. and Wimmer E. (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanine inhibits poliovirus replication. *JBiolChem* **274**, 6992-7001.
- Piatti, P. G., Berinstein, A., Lopez, O. J., Borca, M. V., Fernandez, F., Schudel, A. A. & Sadir, A. M. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J Gen Virol* **72** (Pt 7), 1691-1694.
- Piccone, M. E., Pauszek, S., Pacheco, J., Rieder, E., Kramer, E. & Rodriguez, L. L. (2009). Molecular characterization of a foot-and-mouth disease virus containing a 57-nucleotide insertion in the 3'untranslated region. *Arch Virol* **154**, 671-676.

- Piccone, M. E., Rieder, E., Mason, P. W. & Grubman, M. J. (1995a).** The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J Virol* **69**, 5376-5382.
- Piccone, M. E., Zellner, M., Kumosinski, T. F., Mason, P. W. & Grubman, M. J. (1995b).** Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **69**, 4950-4956.
- Pilipenko, E. V., Maslova, S. V., Sinyakov, A. N. & Agol, V. I. (1992).** Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res* **20**, 1739-1745.
- Pilipenko, E. V., Poperechny, K. V., Maslova, S. V., Melchers, W. J., Slot, H. J. & Agol, V. I. (1996).** Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *Embo J* **15**, 5428-5436.
- Porta, C., Spall, V. E., Lin, T., Johnson, J. E. & Lomonossoff, G. P. (1996).** The development of cowpea mosaic virus as a potential source of novel vaccines. *Intervirology* **39**, 79-84.
- Porta, C., Spall, V. E., Loveland, J., Johnson, J. E., Barker, P. J. & Lomonossoff, G. P. (1994).** Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* **202**, 949-955.
- Qiu, P., Ziegelhoffer, P., Sun, J. & Yang, N. S. (1996).** Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther* **3**, 262-268.
- Racaniello V.R. (2001).** Picornaviridae: The viruses and their replication. *En Fields Virology (Fields B, Roizman B, Knipe D M, Griffin DE, Martin MA, Howley P M, Lamb RA, Straus SE eds)*.
- Ramos, R. & Martinez-Salas, E. (1999).** Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosome entry site (IRES). *Rna* **5**, 1374-1383.
- Restifo, N. P., Ying, H., Hwang, L. & Leitner, W. W. (2000).** The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther* **7**, 89-92.
- Revilla, C., Rodriguez-Carreno, M. P., Alvarez, B., Chamorro, S., Alonso, L. M., Ezquerra, A., Alonso, F. & Dominguez, J. (2004).** 2E3, a new marker that selectively identifies porcine CD4+ naive T cells. *Dev Comp Immunol* **28**, 239-250.
- Rieder, E., Bunch, T., Brown, F. & Mason, P. W. (1993).** Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol* **67**, 5139-5145.
- Rieder, E., Paul, A. V., Kim, D. W., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2000).** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* **74**, 10371-10380.
- Rigden, R. C., Carrasco, C. P., Barnett, P. V., Summerfield, A. & McCullough, K. C. (2003).** Innate immune responses following emergency vaccination against foot-and-mouth disease virus in pigs. *Vaccine* **21**, 1466-1477.
- Roberts, P. J. & Belsham, G. J. (1995).** Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease. *Virology* **213**, 140-146.

- Robertson, B. H., Grubman, M. J., Weddell, G. N., Moore, D. M., Welsh, J. D., Fischer, T., Dowbenko, D. J., Yansura, D. G., Small, B. & Kleid, D. G. (1985). Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J Virol* **54**, 651-660.
- Rodriguez-Carreno, M. P., Lopez-Fuertes, L., Revilla, C., Ezquerra, A., Alonso, F. & Dominguez, J. (2002). Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* **259**, 171-179.
- Rodriguez, A., Dopazo, J., Saiz, J. C. & Sobrino, F. (1994). Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine. *Arch Virol* **136**, 123-131.
- Rodriguez, A., Ley, V., Ortuno, E., Ezquerra, A., Saalmuller, A., Sobrino, F. & Saiz, J. C. (1996). A porcine CD8+ T cell clone with heterotypic specificity for foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* **77** ( Pt 9), 2089-2096.
- Rodriguez, L. L., Barrera, J., Kramer, E., Lubroth, J., Brown, F. & Golde, W. T. (2003). A synthetic peptide containing the consensus sequence of the G-H loop region of foot-and-mouth disease virus type-O VP1 and a promiscuous T-helper epitope induces peptide-specific antibodies but fails to protect cattle against viral challenge. *Vaccine* **21**, 3751-3756.
- Rohll, J. B., Moon, D. H., Evans, D. J. & Almond, J. W. (1995). The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J Virol* **69**, 7835-7844.
- Roosien, J., Belsham, G. J., Ryan, M. D., King, A. M. & Vlak, J. M. (1990). Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. *J Gen Virol* **71** ( Pt 8), 1703-1711.
- Rosas, M. F., Martinez-Salas, E. & Sobrino, F. (2003). Stable expression of antisense RNAs targeted to the 5' non-coding region confers heterotypic inhibition to foot-and-mouth disease virus infection. *J Gen Virol* **84**, 393-402.
- Rueckert R. R. (1996). Picornaviridae: the viruses and their replication. *B N Fields, D M Knipe, and P H Howley (ed), Fields virology, 3rd ed Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa*, 609-654.
- Rueckert, R. R. & Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol* **50**, 957-959.
- Ryan, M. D. & Flint, M. (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* **78** ( Pt 4), 699-723.
- Ryan, M. D., King, A. M. & Thomas, G. P. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* **72** ( Pt 11), 2727-2732.
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A. & Mason, P. W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* **71**, 5115-5123.
- Saiz, J. C., Rodriguez, A., Gonzalez, M., Alonso, F. & Sobrino, F. (1992). Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins. *J Gen Virol* **73** ( Pt 10), 2601-2607.
- Saiz, M., De La Morena, D. B., Blanco, E., Nunez, J. I., Fernandez, R. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (2003). Detection of foot-and-mouth disease virus from culture and clinical samples by reverse transcription-PCR coupled to restriction enzyme and sequence analysis. *Vet Res* **34**, 105-117.

- Saiz, M., Gomez, S., Martinez-Salas, E. & Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**, 93-101.
- Salguero, F. J., Sanchez-Martin, M. A., Diaz-San Segundo, F., de Avila, A. & Sevilla, N. (2005). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology* **332**, 384-396.
- Salt J.S. (2004). Persistence of foot-and-mouth disease virus. . In "*Foot-and-mouth disease: current perspectives*" (Sobrino, F and Domingo, E, Eds) *Horizon Bioscience*, Wymondham, England, 103-145.
- Salt, J. S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J* **149**, 207-223.
- Salt, J. S., Mulcahy, G. & Kitching, R. P. (1996). Isotype-specific antibody responses to foot-and-mouth disease virus in sera and secretions of 'carrier' and 'non-carrier' cattle. *Epidemiol Infect* **117**, 349-360.
- Sangar, D. V., Black, D. N., Rowlands, D. J. & Brown, F. (1977a). Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J Gen Virol* **35**, 281-297.
- Sangar, D. V., Newton, S. E., Rowlands, D. J. & Clarke, B. E. (1987). All foot and mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUGs. *Nucleic Acids Res* **15**, 3305-3315.
- Sangar, D. V., Rowlands, D. J., Harris, T. J. & Brown, F. (1977b). Protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA. *Nature* **268**, 648-650.
- Sanz-Parra, A., Jimenez-Clavero, M. A., Garcia-Briones, M. M., Blanco, E., Sobrino, F. & Ley, V. (1999a). Recombinant viruses expressing the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology* **259**, 129-134.
- Sanz-Parra, A., Sobrino, F. & Ley, V. (1998). Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J Gen Virol* **79** ( Pt 3), 433-436.
- Sanz-Parra, A., Vazquez, B., Sobrino, F., Cox, S. J., Ley, V. & Salt, J. S. (1999b). Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J Gen Virol* **80** ( Pt 3), 671-679.
- Sarnow, P. (2003). Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis. *J Virol* **77**, 2801-2806.
- Scudamore, J. M. & Harris, D. M. (2002). Control of foot and mouth disease: lessons from the experience of the outbreak in Great Britain in 2001. *Rev Sci Tech* **21**, 699-710.
- Scheel, B., Braedel, S., Probst, J., Carralot, J. P., Wagner, H., Schild, H., Jung, G., Rammensee, H. G. & Pascolo, S. (2004). Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur J Immunol* **34**, 537-547.
- Sellers, R. F. (1963). Multiplication, interferon production and sensitivity of virulent and attenuated strains of the virus of foot-and-mouth disease. *Nature* **198**, 1228-1229.
- Skinner, H. H. (1951). Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc R Soc Med* **44**, 1041-1044.

- Snowdon, W. A. (1966).** Growth of foot-and mouth disease virus in monolayer cultures of calf thyroid cells. *Nature* **210**, 1079-1080.
- Sobrinho, F., Davila, M., Ortin, J. & Domingo, E. (1983).** Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**, 310-318.
- Sobrinho, F. & Domingo, E. (2001).** Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep* **2**, 459-461.
- Sobrinho, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M. A., Nunez, J. I., Rosas, M. F., Baranowski, E. & Ley, V. (2001).** Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* **32**, 1-30.
- Steward, M. W., Stanley, C. M., Dimarchi, R., Mulcahy, G. & Doel, T. R. (1991).** High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. *Immunology* **72**, 99-103.
- Stocker, M., and MacPherson, I. (1964).** Syrian hamster fibroblasts cell line and its derivatives. *Nature* **203**, 155-157.
- Strohmaier, K., Franze, R. & Adam, K. H. (1982).** Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol* **59**, 295-306.
- Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E. & Vieweg, J. (2003).** Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* **63**, 2127-2133.
- Su, Z., Peluso, M. V., Raffegerst, S. H., Schendel, D. J. & Roskrow, M. A. (2001).** The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease. *Eur J Immunol* **31**, 947-958.
- Sullenger, B. A. & Gilboa, E. (2002).** Emerging clinical applications of RNA. *Nature* **418**, 252-258.
- Surovoi, A., Ivanov, V. T., Chepurkin, A. V., Ivaniushchenkov, V. N. & Driagalin, N. N. (1988).** [Is the Arg-Gly-Asp sequence the site for foot-and-mouth disease virus binding with cell receptor?]. *Bioorg Khim* **14**, 965-968.
- Sutmoller, P., Barteling, S. S., Olascoaga, R. C. & Sumption, K. J. (2003).** Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **91**, 101-144.
- Sutmoller, P. & McVicar, J. W. (1976).** Pathogenesis of foot-and-mouth disease: clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viraemia. *J Hyg (Lond)* **77**, 245-253.
- Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D. & Sonenberg, N. (2001).** Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *Rna* **7**, 1743-1752.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Nunez, J. I., Rodriguez, A., Saiz, J. C., Blanco, E., Valero, M. L., Roig, X., Camarero, J. A., Andreu, D., Mateu, M. G., Giralt, E., Domingo, E., Sobrinho, F. & Palma, E. L. (1997).** A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol* **71**, 2606-2614.

- Takamatsu, H. H., Denyer, M. S., Stirling, C., Cox, S., Aggarwal, N., Dash, P., Wileman, T. E. & Barnett, P. V. (2006).** Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* **112**, 49-61.
- Tam, J. P., Lu, Y. A. & Yang, J. L. (2002).** Antimicrobial dendrimeric peptides. *Eur J Biochem* **269**, 923-932.
- Tami, C., Taboga, O., Berinstein, A., Nunez, J. I., Palma, E. L., Domingo, E., Sobrino, F. & Carrillo, E. (2003).** Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus in vivo. *J Virol* **77**, 1219-1226.
- Tang, D. C., DeVit, M. & Johnston, S. A. (1992).** Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**, 152-154.
- Tesar, M. & Marquardt, O. (1990).** Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology* **174**, 364-374.
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., Creigh-Tyte, S. & Brown, C. (2002).** Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev Sci Tech* **21**, 675-687.
- Thomson G.R., V. W., Bastos A.D.S. (2003).** Foot-and-mouth disease in wildlife. *Virus Res* **91**, 145-161.
- Tijsterman, M., Ketting, R. F. & Plasterk, R. H. (2002).** The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* **36**, 489-519.
- Tiley, L., King, A. M. & Belsham, G. J. (2003).** The foot-and-mouth disease virus cis-acting replication element (cre) can be complemented in trans within infected cells. *J Virol* **77**, 2243-2246.
- Timoney J. F., G. J. H., Scott F. W., and Barlough J. E., (1988).** Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. *Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, London*, 647-667.
- Todd, S., Towner, J. S., Brown, D. M. & Semler, B. L. (1997).** Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol* **71**, 8868-8874.
- Toyoda, H., Franco, D., Fujita, K., Paul, A. V. & Wimmer, E. (2007).** Replication of poliovirus requires binding of the poly(rC) binding protein to the cloverleaf as well as to the adjacent C-rich spacer sequence between the cloverleaf and the internal ribosomal entry site. *J Virol* **81**, 10017-10028.
- Ulmer, J. B., Deck, R. R., Dewitt, C. M., Donnelly, J. I. & Liu, M. A. (1996).** Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* **89**, 59-67.
- Ulmer, J. B., Fu, T. M., Deck, R. R., Friedman, A., Guan, L., DeWitt, C., Liu, X., Wang, S., Liu, M. A., Donnelly, J. J. & Caulfield, M. J. (1998).** Protective CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol* **72**, 5648-5653.
- Usha, R., Rohll, J. B., Spall, V. E., Shanks, M., Maule, A. J., Johnson, J. E. & Lomonosoff, G. P. (1993).** Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* **197**, 366-374.

- Van Bakkum J. G., F. H. S., Frederiks H. H. J., and Frenkel S., (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr Diergeneeskde* **84**, 1159-1164.
- van Bakkum, J. G. (1969). Session of Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease, Brescia, Italy, FAO.
- Van kuppeveld, F. J., Melchers, W. J., Kirkegaard, K. & Doedens, J. R. (1997). Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology* **227**, 111-118.
- van Lierop, M. J., Wagenaar, J. P., van Noort, J. M. & Hensen, E. J. (1995). Sequences derived from the highly antigenic VP1 region 140 to 160 of foot-and-mouth disease virus do not prime for a bovine T-cell response against intact virus. *J Virol* **69**, 4511-4514.
- van Ooij, M. J., Glaudemans, D. H., Heus, H. A., van Kuppeveld, F. J. & Melchers, W. J. (2006). Structural and functional integrity of the coxsackievirus B3 oriR: spacing between coaxial RNA helices. *J Gen Virol* **87**, 689-695.
- Vassilev, V. B., Gil, L. H. & Donis, R. O. (2001). Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhea virus. *Vaccine* **19**, 2012-2019.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N. & Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* **74**, 7064-7071.
- Vignuzzi, M., Wendt, E. & Andino, R. (2008). Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nat Med* **14**, 154-161.
- Vilcek J, S. G. (1996). Interferons and other cytokines. in *Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds): Fields Virology Philadelphia, Lippincott-Raven, pp 341-365*.
- Wang, J. H., Liang, C. M., Peng, J. M., Shieh, J. J., Jong, M. H., Lin, Y. L., Sieber, M. & Liang, S. M. (2003). Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **21**, 3721-3729.
- Ward, G., Rieder, E. & Mason, P. W. (1997). Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J Virol* **71**, 7442-7447.
- Weide, B., Carralot, J. P., Reese, A., Scheel, B., Eigentler, T. K., Hoerr, I., Rammensee, H. G., Garbe, C. & Pascolo, S. (2008). Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J Immunother* **31**, 180-188.
- Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D. M., Robertson, N., Carrillo, C., Sadir, A. M., Morris, T. J. & Borca, M. V. (1999). Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology* **264**, 85-91.
- Wild, T. F., Burroughs, J. N. & Brown, F. (1969). Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* **4**, 313-320.
- Witwer, C., Rauscher, S., Hofacker, I. L. & Stadler, P. F. (2001). Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res* **29**, 5079-5089.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465-1468.

- Xie, Q. C., McCahon, D., Crowther, J. R., Belsham, G. J. & McCullough, K. C. (1987). Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J Gen Virol* **68** ( Pt 6), 1637-1647.
- Yafal, A. G. & Palma, E. L. (1979). Morphogenesis of foot-and-mouth disease virus. I. Role of procapsids as virion Precursors. *J Virol* **30**, 643-649.
- Yang, C. D., Liao, J. T., Lai, C. Y., Jong, M. H., Liang, C. M., Lin, Y. L., Lin, N. S., Hsu, Y. H. & Liang, S. M. (2007). Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnol* **7**, 62.
- Yang P.C., C. R. M., Chung W. B., and Sung H. T., (1999). Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. *Vet Rec* **145**, 731-734.
- Yang, Y., Yi, M., Evans, D. J., Simmonds, P. & Lemon, S. M. (2008). Identification of a Conserved RNA Replication Element (cre) within the 3Dpol-Coding Sequence of Hepatoviruses. *J Virol*.
- Yusibov, V., Modelska, A., Stepkowski, K., Agadjanyan, M., Weiner, D., Hooper, D. C. & Koprowski, H. (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5784-5788.
- Zamorano, P. I., Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D. M., Escribano, J. M., Sadir, A. M. & Borca, M. V. (1998). Induction of anti foot and mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1. *Vaccine* **16**, 558-563.
- Zhang, A., Jin, H., Zhang, F., Ma, Z., Tu, Y., Ren, Z., Zhang, X., Zhu, K. & Wang, B. (2005). Effects of multiple copies of CpG on DNA vaccination. *DNA Cell Biol* **24**, 292-298.
- Zhang, B., Dong, H., Stein, D. A., Iversen, P. L. & Shi, P. Y. (2008). West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology* **373**, 1-13.
- Zhang, Q., Zhu, M. W., Yang, Y. Q., Shao, M., Zhang, Z. Y., Lan, H. Y., Yan, W. Y., Wu, J. J. & Zheng, Z. X. (2003). A recombinant fusion protein and DNA vaccines against foot-and-mouth disease virus type Asia 1 infection in guinea pigs. *Acta Virol* **47**, 237-243.
- Zhang, Z. D., Hutching, G., Kitching, P. & Alexandersen, S. (2002). The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Arch Virol* **147**, 2157-2167.
- Zhang, Z. D. & Kitching, R. P. (2001). The localization of persistent foot and mouth disease virus in the epithelial cells of the soft palate and pharynx. *J Comp Pathol* **124**, 89-94.
- Zhao, Q., Pacheco, J. M. & Mason, P. W. (2003). Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in animals. *J Virol* **77**, 3269-3280.
- Zhou, X., Berglund, P., Rhodes, G., Parker, S. E., Jondal, M. & Liljestrom, P. (1994). Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine* **12**, 1510-1514.



- Zibert, A., Maass, G., Strebel, K., Falk, M. M. & Beck, E. (1990).** Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol* **64**, 2467-2473.
- Zinkernagel, R. M., LaMarre, A., Ciurea, A., Hunziker, L., Ochsenbein, A. F., McCoy, K. D., Fehr, T., Bachmann, M. F., Kalinke, U. & Hengartner, H. (2001).** Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv Immunol* **79**, 1-53.
- Zoll, J., Heus, H. A., van Kuppeveld, F. J. & Melchers, W. J. (2009).** The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Res* **139**, 209-216.







## **ANEXO**





# The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA–RNA interactions with the 5' end region

Paula Serrano,<sup>1</sup> Miguel Rodríguez Pulido,<sup>2</sup> Margarita Sáiz<sup>1,2</sup> and Encarnación Martínez-Salas<sup>1</sup>

## Correspondence

Encarnación Martínez-Salas  
emartinez@cbm.uam.es

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, 28049 Madrid, Spain

<sup>2</sup>CISA-INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

The untranslated regions (UTRs) of the foot-and-mouth disease virus (FMDV) genome contain multiple functional elements. In the 5' UTR, the internal ribosome entry site (IRES) element governs cap-independent translation initiation, whereas the S region is presumably involved in RNA replication. The 3' UTR, composed of two stem–loops and a poly(A) tract, is required for viral infectivity and stimulates IRES activity. Here, it was found that the 3' end established two distinct strand-specific, long-range RNA–RNA interactions, one with the S region and another with the IRES element. These interactions were not observed with the 3' UTR of a different picornavirus. Several results indicated that different 3' UTR motifs participated in IRES or S region interactions. Firstly, a high-order structure adopted by both the entire IRES and the 3' UTR was essential for RNA interaction. In contrast, the S region interacted with each of the stem–loops. Secondly, S–3' UTR interaction but not IRES–3' UTR interaction was dependent on a poly(A)-dependent conformation. However, no other complexes were observed in mixtures containing the three transcripts, suggesting that these regions did not interact simultaneously with the 3' UTR probe. Cellular proteins have been found to bind the S region and one of these also binds to the 3' UTR in a competitive manner. Our data suggest that 5'–3'-end bridging through both direct RNA–RNA contacts and RNA–protein interactions may play an essential role in the FMDV replication cycle.

Received 22 March 2006

Accepted 16 June 2006

## INTRODUCTION

The foot-and-mouth disease virus (FMDV) genome consists of a positive-sense RNA of about 8500 nt encoding a polyprotein, which is processed into the mature viral products. In common with all picornaviruses, the 5' end of the viral RNA is linked covalently to the viral protein VPg and the 3' end is polyadenylated. 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of approximately 1300 and 100 nt, respectively, flank the single open reading frame (Belsham & Martínez-Salas, 2004). The FMDV 5' UTR displays the most complex organization among picornavirus, comprising the S region, a poly(C) tract, several pseudoknots, the *cis*-acting replication element (*cre*) and the internal ribosome entry site (IRES). The S region, spanning about 360 nt at the 5' terminus of the viral RNA, is predicted to form a long hairpin structure (Escarmis *et al.*, 1992; Witwer *et al.*, 2001). An important role in replication is assumed for this region, although direct evidence for protein interactions or the molecular mechanisms involved is still lacking. In poliovirus (PV), the 5' end of the genome adopts a cloverleaf structure that has been shown to interact with the cellular and viral proteins poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2) and 3CD proteinase, respectively (Gamarnik & Andino, 1997; Parsley

*et al.*, 1997). A role for these interactions has been proposed in regulating the switch from translation to replication (Gamarnik & Andino, 1998). A second role in RNA circularization has been also suggested, as PCBP2 binds to the poly(A)-binding protein (PABP), which is known to interact with the viral poly(A) tail (Herold & Andino, 2001).

The FMDV IRES (about 450 nt), mediating cap-independent translation of the viral RNA, has been studied extensively (Martínez-Salas & Fernández-Miragall, 2004). The essential domains, RNA secondary structure and interaction with cellular proteins have been described (Fernández-Miragall & Martínez-Salas, 2003; Fernández-Miragall *et al.*, 2006; López de Quinto & Martínez-Salas, 1997, 2000; Pilipenko *et al.*, 2000; Stassinopoulos & Belsham, 2001; Walter *et al.*, 1999). Secondary structure analysis of the FMDV 3' UTR sequence predicts the presence of two stable stem–loops. This region is strictly required for replication and infectivity (Sáiz *et al.*, 2001). In other picornaviruses, the 3' UTR is organized into two stem–loops that adopt a quasi-globular organization (Melchers *et al.*, 2000) and constitute essential determinants of virus replication (Brown *et al.*, 2005; Dobrikova *et al.*, 2003; Melchers *et al.*, 1997).



Several strategies have been proposed for 5′–3′-end contacts in positive-strand RNA viruses, including rotaviruses, picornaviruses and pestiviruses, all involving RNA-binding proteins (Herold & Andino, 2001; Isken *et al.*, 2003, 2004; Piron *et al.*, 1998; Vende *et al.*, 2000). To our knowledge, no data regarding genome circularization based on direct RNA–RNA interaction have been reported for picornaviruses. A direct RNA–RNA cyclization mediated by genomic complementary sequences (5′ and 3′ CS) present in the capsid-coding region and the 3′ UTR, respectively, has been proposed for flaviviruses (Corver *et al.*, 2003; Khromykh *et al.*, 2001, 2003; Shurtleff *et al.*, 2001). A recent report using atomic force microscopy showed that dengue virus RNA circularizes through RNA–RNA interactions in the absence of proteins (Alvarez *et al.*, 2005). An additional pair of complementary sequences located at the 5′ end upstream of the initiator AUG and at the 3′ end was also identified as necessary, together with the 5′ and 3′ CS, for cyclization. The requirement for Mg<sup>2+</sup> ions for 5′–3′ associations strongly suggests tertiary interactions in the RNA.

We have shown previously that the FMDV 3′ UTR stimulates IRES activity, even in the absence of a poly(A) tail (Lopez de Quinto *et al.*, 2002), suggesting a functional link between the IRES, which resides at the 5′ end, and the 3′ end of the genomic viral RNA. This interaction could take place through direct RNA–RNA contacts, through protein bridges mediating RNA circularization or both. In this work, we conducted studies aimed at understanding the involvement of the 3′-terminal region in viral IRES stimulation and replication efficiency. We have shown here that regions located at the 5′ and 3′ ends of the FMDV genome interact through strand-specific RNA–RNA contacts. Two different elements, S and IRES, present at the 5′ end, interacted with the 3′ UTR in a dose-dependent manner. No interaction was observed with the 3′ UTR of swine vesicular disease virus (SVDV), a picornavirus that produces similar symptoms in infected animals. The regions involved in the RNA–RNA contacts were dissected and the resulting interaction patterns analysed. A high-order RNA structure adopted by both the complete IRES and the 3′ UTR was essential for RNA interaction, whereas the S region could interact with each of the 3′ UTR stem-loops. Additionally, we detected specific cellular proteins interacting with the S region. One of these, p47, competed for binding to the 3′ UTR. Our data on FMDV 5′–3′-end bridging, involving both direct RNA–RNA contacts and RNA–protein interactions, provide a mechanistic basis for translation stimulation, and possibly replication, of the viral RNA.

## METHODS

**Plasmids.** cDNAs corresponding to the S regions (nt 1–367) of FMDV strains O1K and CS-8 viral RNAs (Escarmis *et al.*, 1992) were amplified by RT-PCR using primers Sac-S-R-C (5′-GGAACGAGCTCTGAAAGGCGGGTTTCGGGTGAC-3′), Sac-S-R-O (5′-GGAACGAGCTCTGAAAGGCGGGTCGGGTGAC-3′) and Sac-s-L-O/C (5′-GGAACGAGCTCTGAAAGGGGCGCTAGGGTCTCAC-3′), which introduced flanking *SacI* restriction sites

(underlined). PCR products were digested with *SacI* and cloned in both orientations into Bluescript II SK+, which had been linearized previously with *SacI* and dephosphorylated.

Plasmid subTAG containing the complete FMDV 3′ UTR (FMDV-TAG) has been described previously (Lopez de Quinto *et al.*, 2002). pSL1 and pSL2 plasmids carried 3′ end sequences corresponding to the SL1 and SL2 predicted stem-loops. These constructs were made in two consecutive steps. Firstly, the full-length clone pDM FMDV-O1K (Sáiz *et al.*, 2001) was modified by recombinant PCR to delete the SL1 and SL2 regions precisely (nt 4–33 and 50–82 from the viral RNA stop codon, respectively). Secondly, *MluI*–*HpaI* fragments resulting from these clones, containing the modified 3′ end regions, were filled in with T4 DNA polymerase and ligated into Bluescript II SK+, which had previously been linearized with *SacI*, blunt-ended and dephosphorylated. Plasmid subSVDV contained the 3′ UTR of SVDV plus a 58 nt poly(A) tail and was derived from construct pCHIM (Sáiz *et al.*, 2001) by excision of the *AvrII*–*HpaI* fragment, blunt-ending and cloning into Bluescript II SK+ that had been treated as above. In all cases, the nucleotide sequence of each cDNA was determined using automatic sequencing (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit; Perkin Elmer).

pGEM-based clones containing the full-length FMDV IRES sequence or the different domains have been described previously (López de Quinto *et al.*, 2001; Ramos & Martínez-Salas, 1999).

**In vitro transcription.** Prior to RNA synthesis, plasmids were linearized using *NotI* for the generation of S and 3′ UTR transcripts and using *XhoI* for the IRES transcript. DNA templates lacking the 58 nt poly(A) tail [Δ(A) derivatives] were made by linearization of the corresponding clones with *EcoRV*. Transcription was performed for 1 h at 37 °C using 50 U T7 or T3 RNA polymerase in the presence of 0.5–1 µg linearized DNA template, 50 mM DTT, 0.5 mM rNTPs and 20 U RNasin. When needed, RNA transcripts were labelled uniformly using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP [400 Ci (14.8 TBq) mmol<sup>−1</sup>]. Reactions were incubated for 15 min with 1 U RQ1 DNase and unincorporated isotope was eliminated in MicroSpin G-50 columns.

**Gel-shift assays.** For RNA–RNA interactions, uniformly <sup>32</sup>P-labelled transcripts were incubated independently at 95 °C for 3 min, transferred to ice and mixed with the indicated unlabelled RNAs denatured as above, in 50 mM sodium cacodylate (pH 7.5), 300 mM KCl and 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Ferrandon *et al.*, 1997). Poly(A) probe was 3′-end-labelled using 1 µM cytidine 3′,5′-bis[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]phosphate and RNA ligase (New England Biolabs), as recommended by the manufacturers. For controls, the antisense version of the indicated RNA was synthesized and used as a strand specificity control; tRNA was used as an unrelated negative control. RNA–RNA complexes were allowed to form for 30 min at 37 °C and immediately analysed by electrophoresis in native polyacrylamide gels supplemented with 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fedor & Uhlenbeck, 1990; Fernández-Miragall *et al.*, 2006; Paillart *et al.*, 1996). Electrophoresis was performed at 4 °C for 33 min at 180 V in TBM buffer [45 mM Tris/HCl (pH 8.3), 43 mM boric acid, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>]. In all cases, dried gels were analysed by autoradiography and exposed to a phosphorimager plate to quantify the intensity of the retarded bands, as described previously (Ramos & Martínez-Salas, 1999).

**RNA–protein interaction assays.** S10 extracts from BHK-21 or HeLa cells were prepared as described previously (López de Quinto & Martínez-Salas, 2000). UV cross-linking assays were performed using 20–40 µg native proteins present in S10 extracts and 0.03 pmol of the specific <sup>32</sup>P-labelled RNA. In competition assays, the binding buffer was adjusted to 5 mM HEPES (pH 7.4), 20 mM KCl, 2.5% glycerol, 0.5% NP-40, 0.5 mM DTT, 2.65 mM MgCl<sub>2</sub>, as described previously (Isken *et al.*, 2003). In all cases, the RNA–protein mixture was digested with an excess of RNase A for 30 min at 37 °C, followed by

the addition of SDS-loading buffer, heating for 2 min at 95 °C and electrophoresis through SDS-polyacrylamide gels. The dried gels were used to visualize the  $^{32}$ P-labelled proteins by autoradiography. Immunoprecipitation and Western blot assays were carried out as described previously (López de Quinto *et al.*, 2001).

## RESULTS

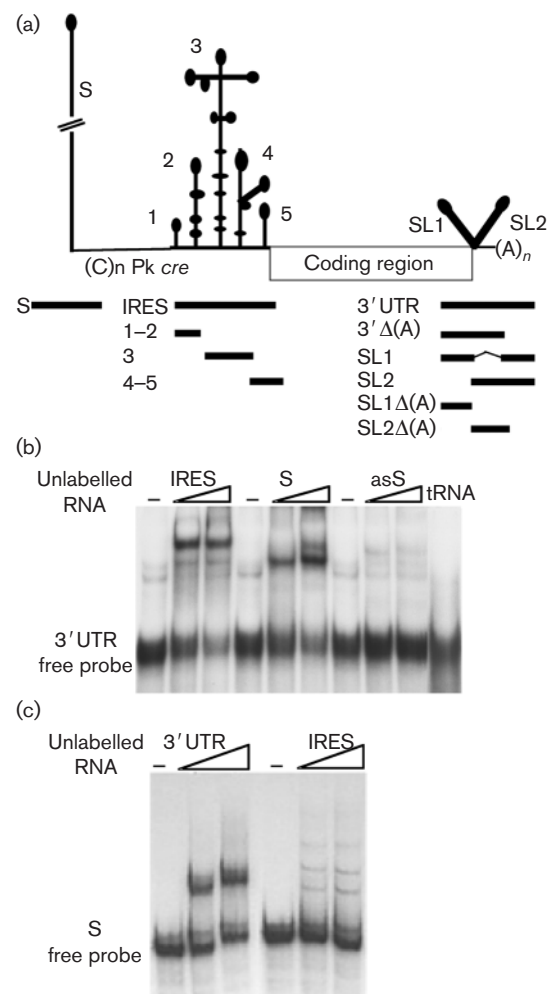
### Strand-specific distant RNA–RNA interactions in the FMDV genome

The FMDV genome contains a long, highly structured 5' UTR, which, together with the 3' UTR, contains regions essential for several steps during the virus replication cycle. In a previous study, we showed specific stimulation of FMDV IRES activity by sequences in the 3' UTR (Lopez de Quinto *et al.*, 2002). 3' UTR sequences have also been shown to be essential for FMDV infectivity (Sáiz *et al.*, 2001).

Here, we investigated the potential involvement of 3' and 5' UTR sequences in establishing a functional link between the ends of the FMDV genome. To this end, transcripts encompassing the S region, the IRES element and different versions of the 3' UTR were generated (Fig. 1a). In order to test the occurrence of direct interactions between the individual RNA elements, a uniformly labelled transcript corresponding to the 3' UTR sequence was incubated with either the IRES or the S region (Fig. 1b). A specific retarded complex was detected in native gels following incubation with the IRES element. An intense complex of higher mobility was also detected following incubation with the S region. Lack of interaction with the S antisense transcript confirmed the strand specificity of these complexes (Fig. 1b). A truncated S transcript of 135 nt, lacking its hairpin structure, was unable to interact with the 3' UTR (data not shown). Furthermore, no interaction was observed with unrelated control RNAs (Fig. 1b).

Considering the RNA–RNA complex intensity observed between the 3' UTR probe and the S region, we asked whether the inverse assay would lead to the same result. Thus, a uniformly labelled S probe was incubated with unlabelled 3' UTR RNA (Fig. 1c). Again, an intense, retarded complex was observed, in agreement with the data in Fig. 1(b). Therefore, interaction between the 3' end and the S region occurred irrespective of the RNA used as the probe. However, the S region did not interact with the IRES element (the faint bands observed had a mobility different from those expected for an S–IRES complex). This result indicated that the 3' UTR was mediating two distinct, specific interactions with different regions in the 5' UTR.

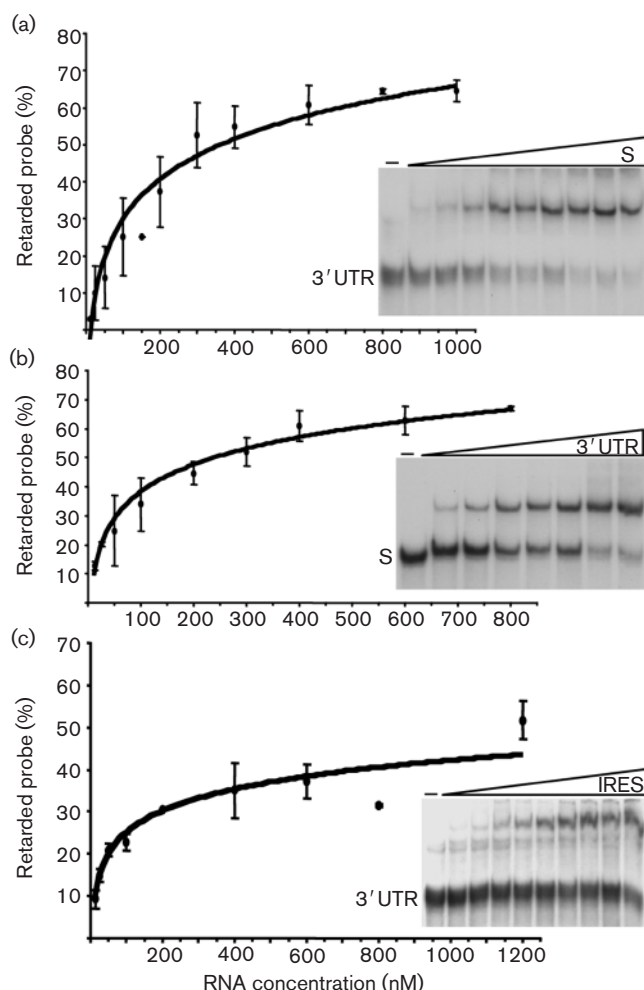
The intensity of retarded complexes was dependent on the concentration of unlabelled RNA present in the binding assay. At the highest RNA concentration, about 65 % of the probe was retarded in the 3' UTR–S interaction (Fig. 2a). The same efficiency of 3' UTR–S interaction was observed, irrespective of the FMDV isolate (C-S8 or O1K) used to obtain the S region (data not shown). The sequence of this



**Fig. 1.** (a) Schematic representation of the FMDV genome. The 360 nt comprising the S region are predicted to fold as a single stem-loop structure (Escarmis *et al.*, 1992). The 3' UTR is organized into two stem-loops, SL1 and SL2, followed by a 58 nt homopolymeric adenine tract (Sáiz *et al.*, 2001). Transcripts encompassing the IRES region have been described previously (López de Quinto *et al.*, 2001). (b) 5' UTR RNA–RNA interactions dependent on the 3' UTR sequence. Uniformly labelled 3' UTR transcript (12.5 nM) was incubated in binding buffer with IRES, S or antisense S (asS) transcripts (0, 200, 400 nM), or with tRNA (400 nM). Complexes were separated on native 6 % acrylamide gels. (c) The S region interacts with the 3' end, but not with the IRES element. Gel-shift assays were performed using uniformly labelled S probe (12.5 nM) and 3' UTR or IRES transcripts (0, 200, 400 nM). Retarded complexes were separated in 4 % native gels.

region differs by about 12 % of its nucleotide sequence between these isolates (Escarmis *et al.*, 1992), although its predicted RNA structure is conserved.

The reverse assay, using labelled S probe and unlabelled 3' UTR transcript, was similarly dependent on RNA concentration (Fig. 2b). Thus, the two ends of the genomic FMDV RNA, the S region and the 3' end, could interact with each



**Fig. 2.** Interaction of the FMDV 5' and 3' ends is RNA concentration dependent. (a) Unlabelled S transcript (12.5–1000 nM) was incubated with labelled 3' UTR probe (12.5 nM) in binding buffer containing 1 mM MgCl<sub>2</sub> and fractionated on a 6% native gel in TBM buffer. (b) The reverse assay was performed using labelled S probe (12.5 nM) and a range concentrations of the 3' UTR transcript (12.5–800 nM). (c) Unlabelled IRES transcript interaction (12.5–1200 nM) with labelled 3' UTR probe. For quantitative analysis, the amount of retarded probe was normalized to the intensity of the entire lane.

other in the absence of proteins, in a dose-dependent manner. In contrast, the efficiency of the 3' UTR–IRES interaction was lower, with 45 % of the probe retarded at saturation (Fig. 2c). In all three cases, only one retarded complex was detected.

### Specific RNA–RNA interaction between the 3' end region and the IRES depends on the integrity of the interacting elements

The interaction observed between the 3' UTR sequences and the IRES region provided a mechanistic basis for the

stimulation of IRES activity mediated by specific viral RNA 3' end sequences (Lopez de Quinto *et al.*, 2002). Deletion studies aimed at mapping the RNA-binding site(s) in the IRES indicated that none of the separate IRES domains retained the ability to interact with the 3' UTR probe, with the exception of a faint binding capacity to domains 4–5 (Fig. 3a). The 3' UTR transcript used in this work contained a tract of 58 adenines, as present in the parental FMDV infectious clone (Sáiz *et al.*, 2001). Deletion of the poly(A) tail in transcript 3'Δ(A) did not impair its binding capacity to the entire IRES (Fig. 3b). In agreement with results using the complete 3' UTR, only domains 4–5 appeared to retain a faint binding capacity to this probe.

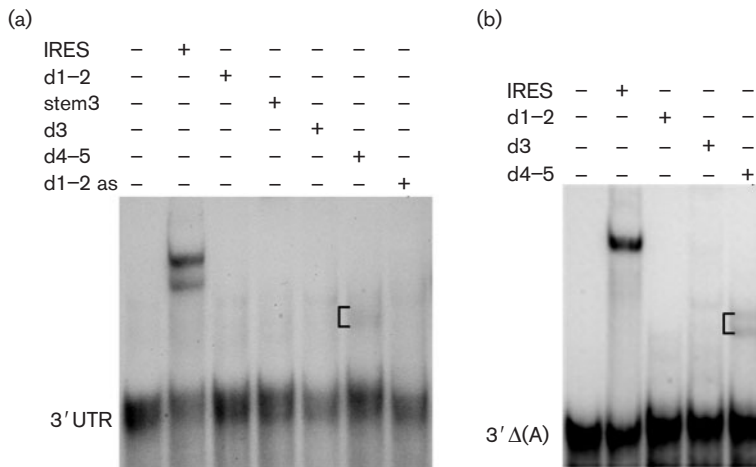
According to computer prediction programs, and consistent with phylogenetic conservation, the 3' UTR is composed of two stem-loops separated by a connecting region of 12 residues (Fig. 4a). A secondary structure comparison of different FMDV isolates belonging to O, A, C, Asia 1 and Sat 1-3 serotypes showed strong conservation of the stem-loops, with most of the nucleotide variability accumulated either in the connecting region or in the unpaired bulges of each stem-loop. Deletions or insertions were scarce.

Two different constructs, SL1 and SL2, were generated in order to map the IRES-interacting residues. Each of these constructs was designed to delete one of the conserved stem-loops precisely, leaving the connecting region and the poly(A) tract intact. Neither SL1 nor SL2 transcripts possessing an intact poly(A) tail interacted with the IRES (data not shown). Likewise, similar transcripts from which the poly(A) tract was missing also exhibited no interaction with the IRES (Fig. 4b).

In favour of the specificity of 3' UTR–IRES interactions, the picornavirus SVDV 3' UTR did not show a significant interaction with the FMDV IRES. The SVDV 3' UTR transcript formed dimers under these conditions to a greater extent than FMDV (Fig. 4b, compare probe 3' SVDV in lane 9 with probe 3' UTR in lane 1). Therefore, taking the results from Figs 3 and 4 together, we concluded that the 3' UTR–IRES interaction was dependent on a high-order structural conformation adopted by each of these complete regions.

### 3' UTR–S RNA–RNA interaction requires a poly(A) tail-induced conformation

To map the position of residues responsible for 3' UTR–S interactions, the 3' UTR transcript was shortened progressively. Elimination of the poly(A) tail in construct 3'Δ(A) abrogated RNA–RNA complex formation (Fig. 5). Probes SL1 and SL2 confirmed that each of these transcripts interacted with the S region, although a different retarded complex pattern was detected. The SL2 transcript, lacking the SL1 stem-loop, appeared to form one complex. However, transcript SL1, lacking the SL2 stem-loop, yielded two similarly intense, retarded complexes. As with the entire



**Fig. 3.** (a) 3' UTR–IRES interaction requires the entire IRES element. Uniformly labelled 3' UTR probe (12.5 nM) was incubated in binding buffer with the indicated domains of the FMDV IRES, schematically represented in Fig. 1a. The antisense (as) version of domains 1–2 was used as a negative control. (b) 3' UTR–IRES interaction is independent of the poly(A) tail. Transcript 3' $\Delta$ (A) contained the 3' end FMDV sequence devoid of the A<sub>58</sub> tail. RNA–RNA complexes were separated on native 6% gels. A weak, retarded complex formed with domains 4–5 is indicated by a bracket.

3' UTR sequence, elimination of the poly(A) tract in each of these transcripts impaired RNA–RNA interaction (Fig. 5). Thus, absence of the poly(A) tail in the 3' end transcripts caused a severe decrease in the efficiency of binding. The SVDV 3' UTR probe containing a poly(A) tail, as with the FMDV 3' UTR, did not result in significant RNA–RNA interactions. On the basis that a poly(A) probe did not yield RNA–RNA complexes with the S region (Fig. 5), we concluded that the interaction observed between the 3' UTR and the S region depended on the poly(A) tract but was not due to interaction with adenine residues.

### The 3' UTR does not interact simultaneously with the IRES and S regions

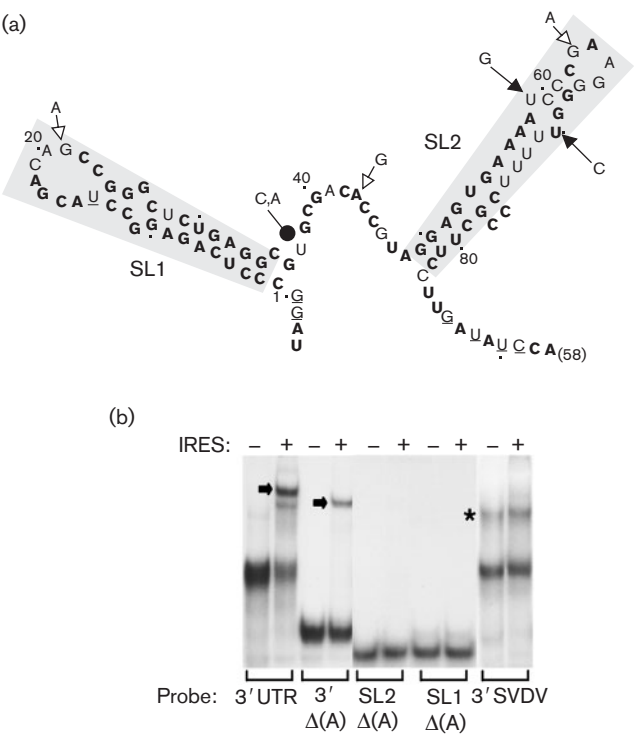
Because of the different functions attributed to the IRES and S regions (translation and replication, respectively) (Belsham & Martínez-Salas, 2004), their shared capacity to interact with the 3' end region found here was surprising. In order to determine the possible prevalence of each one in the RNA–RNA interaction, we carried out a binding assay using combinations of S and IRES transcripts in equimolar amounts to interact with the 3' UTR probe. No decrease in the binding capacity of either of these regions with the 3' UTR probe in the presence of the other was observed (Fig. 6a). A higher concentration of the divalent cation did not modify this result (data not shown). Next, changes in the relative concentrations of IRES and S were used in this assay to assess their simultaneous binding efficiency to the 3' UTR probe. As shown in Fig. 6(b), no other complexes were detected. Instead, as the concentration of one transcript was increased, the efficiency of complex formation of the transcript at the lower concentration decreased. Thus, the S and IRES regions did not interact simultaneously with the 3' UTR under the conditions tested. This feature may have functional implications in the biology of the viral RNA, as differentially circularized RNAs may perform different roles during the virus replication cycle, one preferentially being used for translation and the other for replication.

### The S and 3' end regions interact with a common protein

To our knowledge, no information regarding the ability of the FMDV S region to interact with proteins is available to date. Likewise, its presumed involvement in RNA replication has not been determined precisely (Belsham & Martínez-Salas, 2004). Proteins interacting with the 3' UTR region in a UV cross-linking assay have been reported previously (Lopez de Quinto *et al.*, 2002). Two proteins, p120 and p47, present in HeLa and BHK-21 cell extracts, were found to interact with both the S and 3' UTR probes (Fig. 7a). Additionally, the 3' UTR interacted with p70 and two polypeptides of about 30 and 34 kDa. All of the cross-linked products were sensitive to proteinase K treatment. The interaction of the 3' UTR with p70 was related directly to the presence of the poly(A) tract (Fig. 7b). In addition, p70 was recognized specifically by anti-PABP serum following immunoprecipitation of the 3' UTR-cross-linked extracts (Fig. 7c). The anti-PABP serum has been demonstrated previously to interact with PABP (Burgui *et al.*, 2003). No immunoprecipitation of p70 was observed with control sera raised against unrelated proteins.

To determine whether p47 and p120 interacting with both the 3' UTR and the S region were the same factors, a competition assay was carried out. Pre-incubation of the protein extract with unlabelled 3' UTR RNA led to a reduction in the p47 component bound to the S probe (Fig. 8a), without a significant effect on the binding capacity of p120. In the reverse assay, a similar decrease in p47 binding was observed. The mobility of this protein was coincident with a polypeptide recognized by a specific antiserum generated against PCBP1–PCBP2 (Fig. 8a), a protein previously shown to interact with the PV cloverleaf structure (Gamarnik & Andino, 1997). No competition was observed with any region of the IRES tested (Fig. 8b), including the central domain 3 containing a PCBP-binding site (Stassinopoulos & Belsham, 2001) or the distal domains 4–5, recognized by several initiation factors (López de

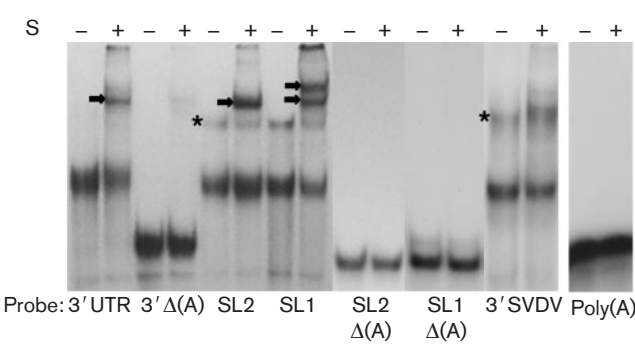




**Fig. 4.** (a) Secondary structure of the FMDV 3' UTR. The RNA structure is depicted according to the MFOLD prediction program, aided by phylogenetic conservation. SL1 and SL2 denote conserved stem-loop structures. Bold symbols denote invariant residues among 33 FMDV isolates including the O, A, C, Asia 1 and Sat 1-3 serotypes deposited in databases. Sequence variability is represented as structural conservative changes (large arrows), abundant substitutions (filled circle) or rare substitutions (small arrows). A dot is positioned every 10 residues and the residues substituted in the infectious construct FMDV-TAG are underlined. Transcript SL1 contained a deletion spanning residues 50–82; the deletion in transcript SL2 spanned residues 4–33. (b) 3' UTR–IRES element interaction requires a structure provided only by the entire 3' end region. The uniformly labelled probes indicated at the bottom of the gel were incubated in binding buffer with the full-length FMDV IRES (200 nM). Probe 3' SVDV was used as a specificity control. An asterisk denotes the position of dimers of the 3' SVDV probe. Arrows denote the position of specific retarded complexes in the 3' UTR and 3'Δ(A) probes.

Quinto *et al.*, 2001). We therefore concluded that p47 was a common factor interacting with both the 3' UTR and the S region of the FMDV genome. This result led us to suggest that p47 might cooperate to bridge the 3' end and S regions in the viral RNA.

To test this possibility, 3' UTR and S transcripts were exposed to protein extracts after a previous RNA–RNA pre-incubation step (Fig. 8c). The simultaneous presence of these RNAs induced a small increase in the binding capacity of p47. In addition, RNA–RNA pre-incubation of S region and 3' UTR transcripts impaired binding of p30/34. This



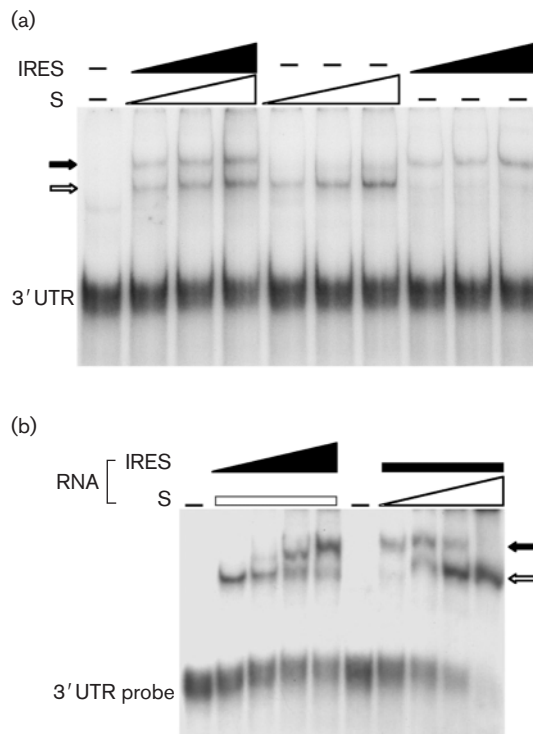
**Fig. 5.** The S element interacts with both 3' UTR stem-loops in a conformation dependent on the poly(A) tail. The probes indicated at the bottom of the gel were incubated in binding buffer with S region transcripts (200 nM). RNA–RNA complexes were separated in native 6% gels; the gel-shift performed with the poly(A) probe was run for a shorter time to retain the free probe on the gel. Arrows denote specific retarded complexes and asterisks denote the position of probe dimers.

result suggested that either the RNA–RNA interaction reorganized the structure required for binding or the binding site was occupied by RNA interactions. Either of these possibilities is compatible with the RNA–RNA interactions shown in this report.

## DISCUSSION

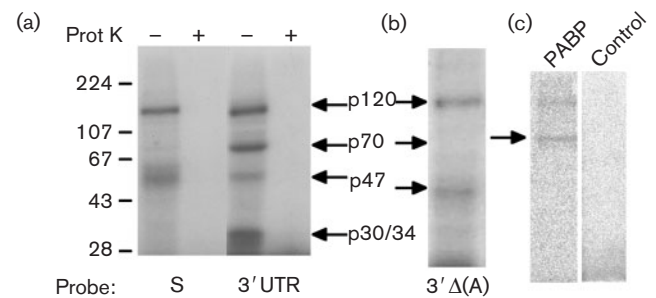
The FMDV genome contains several elements in its UTRs that are well defined from a functional and structural point of view. In the 5' UTR, the IRES element is responsible for the cap-independent translation initiation of the viral RNA (Hellen & Sarnow, 2001; Martínez-Salas *et al.*, 2001), whereas the S region is assumed to be involved in RNA replication (Belsham & Martínez-Salas, 2004). In this study, we found two distinct long-range RNA–RNA interactions dependent on the 3' UTR, one with the S region and another with the IRES element. To our knowledge, this is the first report of RNA–RNA interactions between the ends of a positive-strand viral genome involving two essential but functionally unrelated elements in the 5' UTR.

Various experimental results indicated that, in the case of FMDV, IRES–3' UTR or S–3' UTR RNA–RNA interactions resided in different motifs. Firstly, whereas the IRES element required both 3' UTR stem-loops, SL1 and SL2, in order to allow a physical interaction, the S region was recognized by each of the separate stem-loops. Secondly, S–3' UTR interaction, but not IRES–3' UTR interaction, was dependent on a structural conformation induced by the presence of the poly(A) tract. However, simultaneous binding of the S and IRES regions to the 3' UTR was undetected in mixtures of the three transcripts, even at high RNA concentrations.



**Fig. 6.** (a) The S and IRES elements interact with different residues in the 3' UTR sequence. The uniformly labelled 3' UTR was incubated in binding buffer with increasing S and IRES transcript concentrations (25, 50 and 100 nM), either combined in equimolar amounts or individually. Filled and open arrows denote specific retarded complexes formed with the IRES and S region, respectively. (b) The S and IRES elements do not interact simultaneously with the 3' UTR sequence. On the left, a constant amount of S transcript (50 nM) was incubated with 3' UTR probe, in the presence of increasing IRES concentrations (0, 50, 500 and 1000 nM); on the right, increasing amounts of the S transcript (0, 50, 200 and 800 nM) were incubated with 3' UTR probe in the presence of constant IRES concentration (200 nM). The concentrations of S and IRES transcripts were chosen from Fig. 2 on the basis of their efficiency of retarded complex formation.

A peculiarity exhibited by the genome of picornaviruses belonging to different genera is that genetic hybrids carrying substitutions of functionally homologous regions show compromised infectivity to a certain extent. Thus, exchange of IRES elements between entero- and cardioviruses delays viral growth (Alexander *et al.*, 1994; Gromeier *et al.*, 1996), exchange of 3' UTR sequences between PV and bovine enteroviruses or hepatitis A virus diminishes replication levels (Rohll *et al.*, 1995) and substitution of the SVDV 3' UTR for that of FMDV abrogates viral infectivity (Sáiz *et al.*, 2001). This feature might be attributed to at least two different properties of the picornavirus genome. Firstly, although the genetic organization is similar (Agol, 2002), specific sequences in the respective RNAs have evolved to

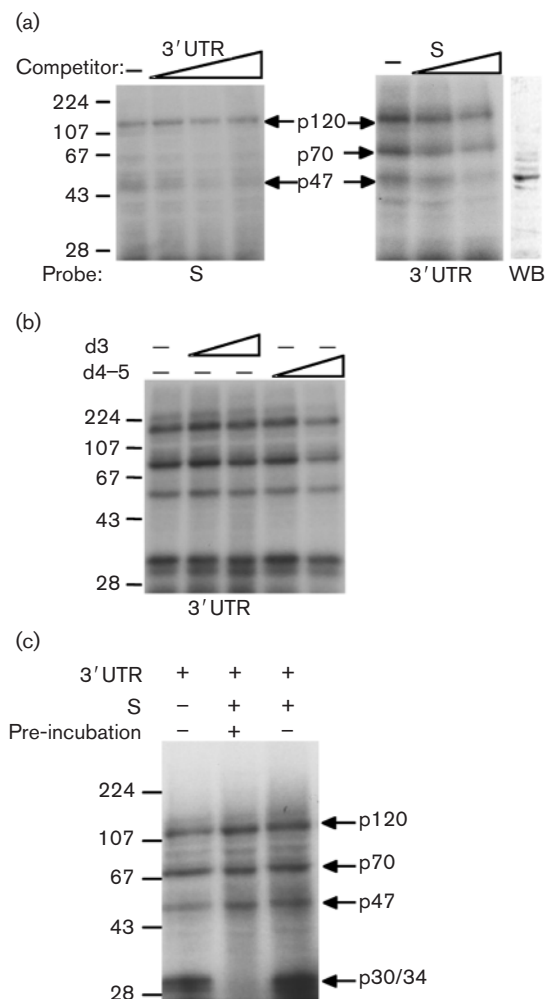


**Fig. 7.** (a) RNA–protein interaction pattern of the S region and the 3' UTR. Autoradiogram of a UV cross-linking assay performed with S probe (0.03 pmol) and S10 proteins (20 µg), treated or not with proteinase K (Prot K), loaded in parallel with proteins interacting with the 3' UTR. (b) RNA–protein interaction pattern of the 3' Δ(A) transcript. (c) Immunoprecipitation of the UV cross-linked products using a rabbit polyclonal anti-PABP serum raised against specific peptides of PABP (Burgui *et al.*, 2003) and a control serum.

interact with different transacting factors, either replication- or translation-competent elements. Secondly, intramolecular interactions involving specific 3' UTR high-order structures would not be conserved appropriately in the resulting genetic hybrid RNA. As shown in this report, the 3' UTR of SVDV did not interact with the S or IRES regions of FMDV, consistent with the functional relevance of the RNA–RNA interactions studied. This is also in accordance with the observation that deletion of the FMDV and PV 3' UTR severely compromises infectivity (Brown *et al.*, 2005; Mellits *et al.*, 1998; Sáiz *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 1997). Our results therefore suggest that viral evolution might be influenced strongly by RNA–RNA intramolecular interactions, conferring phenotypic properties on the viral RNA molecule. Indeed, in spite of the high FMDV genetic variability (Carrillo *et al.*, 2005; Domingo *et al.*, 1992), the secondary structure of the three regulatory regions studied here was conserved.

An *in silico* search of nucleotide sequence complementarities among conserved residues of the 3' UTR and the S region, potentially contributing to distant interactions, showed ten short motifs of 4–5 nt that might be responsible for this contact (data not show). It was striking that the intense IRES–3' UTR interaction observed *in vitro* required the integrity of each region. This result strongly suggested that either a high-order RNA structure, as described for enteroviruses (Melchers *et al.*, 2000; van Ooij *et al.*, 2006), is required to offer the appropriate conformation for efficient binding, or there is a cooperative effect, since the individual stem-loops were not sufficient to stabilize the binding.

Translation and replication occur as consecutive but not simultaneous steps on the same viral RNA molecule during the picornavirus infectious cycle (Gamarnik & Andino,



**Fig. 8.** (a) 3' UTR and S regions compete for binding to p47. A molar excess of 50-, 200- and 400-fold unlabelled 3' UTR RNA was added to the UV cross-linked reaction with labelled S RNA and vice versa. The far right-hand panel shows a Western blot carried out with BHK-21 cell extracts using a 1:1000 dilution of a specific anti-PCBP1/PCBP2 serum (Gamarnik & Andino, 1997). (b) Lack of competition of FMDV IRES domains d3 and d4-5, performed as in (a). (c) Effect of RNA-RNA pre-incubation on RNA-protein interactions, showing the UV cross-linking pattern obtained with the S and 3' UTR probes, pre-incubated for 30 min at 37 °C to allow RNA-RNA complex formation. Proteins were resolved by SDS-PAGE (10% gel).

1998; Novak & Kirkegaard, 1994). We have demonstrated that the 3' UTR-IRES interaction occurred independently of the S-3' UTR interaction, indicating that different residues are involved in these interactions. On the other hand, these interactions did not occur simultaneously in the same molecule. Indeed, no third complexes were detected when a wide RNA concentration range of both transcripts was added to a binding assay with a 3' UTR probe. It is possible that a switch from translation to replication, as

suggested for PV (Gamarnik & Andino, 1998), may be governed by a transition from the 3' UTR-IRES to the 3' UTR-S interaction during the early stages of infection. Further experiments are required to test this possibility and to determine the factors that could participate in this transition.

Genome circularization promoted essentially by a single RNA-RNA interaction has been shown recently in flaviviruses (Alvarez *et al.*, 2005). In this case, inverted terminal repeats had been noted previously (Hahn *et al.*, 1987; You *et al.*, 2001). Direct RNA-RNA interaction between a small number of residues in 3' and 5' UTR sequences has been demonstrated to control cap-independent translation initiation in RNA plant viruses (Fabian & White, 2004; Guo *et al.*, 2001; Shen & Miller, 2004) that may be reminiscent of 5'-3'-end interaction in cap-dependent translation initiation of cellular mRNAs (Hentze, 1997).

The possibility that proteins might further stabilize RNA-RNA bridges in the FMDV genome is open. In the case of flavivirus, it has been shown that several proteins, including elongation factor 1- $\alpha$ , La and PTB, interact with the 3' UTR (De Nova-Ocampo *et al.*, 2002). A large complex of the NFAR family has been proposed to interact with the 5' and 3' UTRs of the pestivirus genome, possibly acting as regulators of the virus life cycle (Isken *et al.*, 2003, 2004). In our assays, four polypeptides were shown to interact specifically with the 3' UTR region. Currently, the nature of the p120 and p30/34 interaction with the FMDV 3' UTR still needs to be determined. Specific p70 immunoprecipitation with anti-PABP sera, together with lack of interaction with transcripts devoid of a poly(A) tail, strongly supports the conclusion that p70 corresponds to PABP. Immunodetection assays are consistent with p47 presumably corresponding to PCBP, another candidate to interact with the poly(C) tract. Three C-rich motifs interspersed in the 3' UTR suggest the possibility of more than one PCBP contact site, as appears to be the case in the PV IRES (Bedard *et al.*, 2004). Similarly, several C-rich motifs were present in the S region (data not shown). There is no apparent conservation between the PV cloverleaf structure and the S region of FMDV. However, some of the C-rich motifs resemble the ACCCCA primary sequence shown to be the preferential binding site of PCBP (Gamarnik & Andino, 1997; Parsley *et al.*, 1997). No competition was observed with the central domain of the FMDV IRES, previously inferred to interact with PCBP from RNA depletion assays (Stassinopoulos & Belsham, 2001). Thus, binding of PCBP to the S and 3' UTR FMDV regions displayed a higher affinity than that to the IRES element. It therefore remains possible that this protein interacts with the most distal regions of the FMDV genome, probably reinforcing the RNA-RNA S-3' UTR interaction demonstrated here.

The dual involvement of the 3' UTR in controlling viral RNA translation and virus replication highlights the relevance of this region in the infectious virus life

cycle, making it a suitable candidate for targeted antiviral therapy.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to R. Andino and A. Nieto for the anti-PCBP and anti-PABP antisera, respectively; Silvia Gómez for early contributions to the SL1 and SL2 constructs and O. Fernández-Miragall for advice with the RNA–RNA interaction assays. M.S. is the holder of a grant from ‘Programa Ramón y Cajal’ from the Spanish Ministry of Education and Science. This work was supported by grants BMC2002-00983, BFU2005-00948 to E.M.-S., RTA03-201 to M.S. and by an Institutional grant from Fundación Ramón Areces.

## REFERENCES

- Agol, V. A. (2002).** Picornavirus genome: an overview. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, pp. 127–148. Edited by B. L. Semler & E. Wimmer. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Alexander, L., Lu, H. H. & Wimmer, E. (1994).** Polioviruses containing picornavirus type 1 and/or type 2 internal ribosomal entry site elements: genetic hybrids and the expression of a foreign gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1406–1410.
- Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Ludeña, S. J., Pietrasanta, L. I. & Gamarnik, A. V. (2005).** Long-range RNA–RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* **79**, 6631–6643.
- Bedard, K. M., Walter, B. L. & Semler, B. L. (2004).** Multimerization of poly(rC) binding protein 2 is required for translation initiation mediated by a viral IRES. *RNA* **10**, 1266–1276.
- Belsham, G. J. & Martínez-Salas, E. (2004).** Genome organisation, translation and replication of foot-and-mouth disease virus RNA. In *Foot and Mouth Disease: Current Perspectives*, pp. 19–52. Edited by E. Domingo & F. Sobrino. Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Brown, D. M., Cornell, C. T., Tran, G. P., Nguyen, J. H. C. & Semler, B. L. (2005).** An authentic 3′ noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* **79**, 11962–11973.
- Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. & Nieto, A. (2003).** PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**, 3263–3274.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2005).** Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**, 6487–6504.
- Corver, J., Lenches, E., Smith, K., Robison, R. A., Sando, T., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (2003).** Fine mapping of a *cis*-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J Virol* **77**, 2265–2270.
- De Nova-Ocampo, M., Villegas-Sepúlveda, N. & del Angel, R. M. (2002).** Translation elongation factor-1 $\alpha$ , La, and PTB interact with the 3′ untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* **295**, 337–347.
- Dobrikova, E., Florez, P., Bradrick, S. & Gromeier, M. (2003).** Activity of a type 1 picornavirus internal ribosomal entry site is determined by sequences within the 3′ nontranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15125–15130.
- Domingo, E., Escarmis, C., Martinez, M. A., Martínez-Salas, E. & Mateu, M. G. (1992).** Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 33–47.
- Escarmis, C., Toja, M., Medina, M. & Domingo, E. (1992).** Modifications of the 5′ untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**, 113–125.
- Fabian, M. R. & White, K. A. (2004).** 5′–3′ RNA–RNA interaction facilitates cap- and poly(A) tail-independent translation of tomato bushy stunt virus mRNA: a potential common mechanism for *Tombusviridae*. *J Biol Chem* **279**, 28862–28872.
- Fedor, M. J. & Uhlenbeck, O. C. (1990).** Substrate sequence effects on “hammerhead” RNA catalytic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1668–1672.
- Fernández-Miragall, O. & Martínez-Salas, E. (2003).** Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA* **9**, 1333–1344.
- Fernández-Miragall, O., Ramos, R., Ramajo, J. & Martínez-Salas, E. (2006).** Evidence of reciprocal tertiary interactions between conserved motifs involved in organizing RNA structure essential for internal initiation of translation. *RNA* **12**, 223–234.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E. & Nüsslein-Volhard, C. (1997).** RNA–RNA interaction is required for the formation of specific *bicoid* mRNA 3′ UTR–STAUEN ribonucleoprotein particles. *EMBO J* **16**, 1751–1758.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1997).** Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5′ noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* **3**, 882–892.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1998).** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **12**, 2293–2304.
- Gromeier, M., Alexander, L. & Wimmer, E. (1996).** Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2370–2375.
- Guo, L., Allen, E. M. & Miller, W. A. (2001).** Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA. *Mol Cell* **7**, 1103–1109.
- Hahn, C. S., Hahn, Y. S., Rice, C. M., Lee, E., Dalgarno, L., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (1987).** Conserved elements in the 3′ untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol* **198**, 33–41.
- Hellen, C. U. T. & Sarnow, P. (2001).** Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**, 1593–1612.
- Hentze, M. W. (1997).** eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* **275**, 500–501.
- Herold, J. & Andino, R. (2001).** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein–protein bridge. *Mol Cell* **7**, 581–591.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. N. & Behrens, S.-E. (2003).** Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO J* **22**, 5655–5665.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Yu, H. & Behrens, S.-E. (2004).** Complex signals in the genomic 3′ nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA* **10**, 1637–1652.
- Khromykh, A. A., Meka, H., Guyatt, K. J. & Westaway, E. G. (2001).** Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol* **75**, 6719–6728.
- Khromykh, A. A., Kondratieva, N., Sgro, J.-Y., Palmenberg, A. & Westaway, E. G. (2003).** Significance in replication of the terminal nucleotides of the *Flavivirus* genome. *J Virol* **77**, 10623–10629.
- López de Quinto, S. & Martínez-Salas, E. (1997).** Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal ribosome entry site domain 3 are required for internal initiation of translation. *J Virol* **71**, 4171–4175.
- López de Quinto, S. & Martínez-Salas, E. (2000).** Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* **6**, 1380–1392.



- López de Quinto, S., Lafuente, E. & Martínez-Salas, E. (2001). IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* 7, 1213–1226.
- Lopez de Quinto, S., Sáiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F. & Martínez-Salas, E. (2002). IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res* 30, 4398–4405.
- Martínez-Salas, E. & Fernández-Miragall, O. (2004). Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr Pharm Des* 10, 3757–3767.
- Martínez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. & López de Quinto, S. (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* 82, 973–984.
- Melchers, W. J. G., Hoenderop, J. G. J., Bruins Slot, H. J., Pleij, C. W. A., Pilipenko, E. V., Agol, V. I. & Galama, J. M. D. (1997). Kissing of the two predominant hairpin loops in the coxsackie B virus 3' untranslated region is the essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 71, 686–696.
- Melchers, W. J. G., Bakkers, J. M. J. E., Bruins Slot, H. J., Galama, J. M. D., Agol, V. I. & Pilipenko, E. V. (2000). Cross-talk between orientation-dependent recognition determinants of a complex control RNA element, the enterovirus *oriR*. *RNA* 6, 976–987.
- Mellits, K. H., Meredith, J. M., Rohll, J. B., Evans, D. J. & Almond, J. W. (1998). Binding of a cellular factor to the 3' untranslated region of the RNA genomes of entero- and rhinoviruses plays a role in virus replication. *J Gen Virol* 79, 1715–1723.
- Novak, J. E. & Kirkegaard, K. (1994). Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes Dev* 8, 1726–1737.
- Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. (1996). A loop-loop “kissing” complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5572–5577.
- Parsley, T. B., Towner, J. S., Blyn, L. B., Ehrenfeld, E. & Semler, B. L. (1997). Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA* 3, 1124–1134.
- Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I. & Hellen, C. U. T. (2000). A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev* 14, 2028–2045.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17, 5811–5821.
- Ramos, R. & Martínez-Salas, E. (1999). Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosome entry site (IRES). *RNA* 5, 1374–1383.
- Rohll, J. B., Moon, D. H., Evans, D. J. & Almond, J. W. (1995). The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J Virol* 69, 7835–7844.
- Sáiz, M., Gómez, S., Martínez-Salas, E. & Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* 82, 93–101.
- Shen, R. & Miller, W. A. (2004). The 3' untranslated region of tobacco necrosis virus RNA contains a barley yellow dwarf virus-like cap-independent translation element. *J Virol* 78, 4655–4664.
- Shurtleff, A. C., Beasley, D. W. C., Chen, J. J. Y. & 9 other authors (2001). Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology* 281, 75–87.
- Stassinopoulos, I. A. & Belsham, G. J. (2001). A novel protein-RNA binding assay: functional interactions of the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site with cellular proteins. *RNA* 7, 114–122.
- Todd, S., Towner, J. S., Brown, D. M. & Semler, B. L. (1997). Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol* 71, 8868–8874.
- van Ooij, M. J. M., Glaudemans, D. H. R. F., Heus, H. A., van Kuppeveld, F. J. & Melchers, W. J. G. (2006). Structural and functional integrity of the coxsackievirus B3 *oriR*: spacing between coaxial RNA helices. *J Gen Virol* 87, 689–695.
- Vende, P., Piron, M., Castagné, N. & Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74, 7064–7071.
- Walter, B. L., Nguyen, J. H., Ehrenfeld, E. & Semler, B. L. (1999). Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements. *RNA* 5, 1570–1585.
- Witwer, C., Rauscher, S., Hofacker, I. L. & Stadler, P. F. (2001). Conserved RNA secondary structures in *Picornaviridae* genomes. *Nucleic Acids Res* 29, 5079–5089.
- You, S., Falgout, B., Markoff, L. & Padmanabhan, R. (2001). *In vitro* RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J Biol Chem* 276, 15581–15591.



# Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins

Miguel Rodríguez Pulido <sup>a</sup>, Paula Serrano <sup>b</sup>, Margarita Sáiz <sup>a,b</sup>, Encarnación Martínez-Salas <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> CISA-INIA, Valdeolmos 28130 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain

Received 2 February 2007; returned to author for revision 7 March 2007; accepted 8 March 2007

Available online 18 April 2007

## Abstract

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection induces major changes in the host cell including the shutoff of cellular protein synthesis. Here, protein extracts from FMDV-infected cells have been used to monitor changes in the profile of RNA-binding factors interacting with regulatory regions of the viral RNA. Relevant differences have been detected in the pattern of interaction with proteins prepared from either infected or uninfected cells with RNA probes encompassing the internal ribosome entry site (IRES), the 5' and 3' end regions. The binding patterns obtained for two divergent FMDV isolates showed differences depending on the viral isolate used. The identity of the host proteins giving a shifted binding pattern to RNA regulatory regions has been inferred by immunoblotting. Our results show that polypyrimidine tract-binding protein (PTB) and two subunits of translation initiation factor eIF3 interacting with the IRES undergo proteolytic processing during FMDV infection. In addition, poly(A)-binding protein (PABP), interacting with the 3' end of the viral RNA is partially processed. Proteolysis of eIF3a, eIF3b, PABP and PTB correlated with the extent of cytopathic effect induced by FMDV in infected cells.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** FMDV; RNA-binding proteins; IRES; S region; 3' end; eIF3; PTB; PABP; Proteolytic cleavage; Infected cells

## Introduction

During picornavirus infection protein synthesis is the first step of the viral life cycle. Translation initiation of these viral RNAs is driven by an internal ribosome entry site (IRES), which directs the translation machinery to an internal start codon (Hellen and Sarnow, 2001; Martínez-Salas et al., 2001). Similar to other picornaviruses, the foot-and-mouth disease virus (FMDV) genome encodes a large polyprotein that is rapidly processed by viral-encoded proteases yielding several precursors and about 15 different mature viral proteins (Mason et al., 2003; Ryan et al., 1989). A distinctive feature of FMDV coding region is the presence of the leader (L) protein that is synthesized in two forms, Lab and Lb (Lopez de Quinto and Martínez-Salas, 1999). The FMDV L proteins are proteases, which cleave the translation initiation factor eIF4G (Devaney et al., 1988) and thus, induce a strong shutdown of cap-dependent

protein synthesis (Belsham and Brangwyn, 1990; Martínez-Salas et al., 1993). Expression of FMDV 3C protease also processes eIF4G (Gradi et al., 2004; Strong and Belsham, 2004) as well as eIF4A (Belsham et al., 2000; Li et al., 2001), a component of eIF4F with RNA helicase activity. To our knowledge, no information is available regarding the integrity of other translation factors during FMDV infection.

In the last years a significant effort has been devoted to study the process of internal translation initiation (Baird et al., 2006; Sarnow, 2003). Using either recombinant proteins or extracts prepared from uninfected cells, a number of proteins including translation initiation factors (eIFs) and auxiliary proteins have been found to associate with IRES elements. Similar to encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES, the FMDV IRES interacts with eIF4G, eIF3, and eIF4B (Lopez de Quinto et al., 2001; Pestova et al., 1996; Pilipenko et al., 2000). In both cases, the eIF4G–IRES interaction is essential for internal initiation. In addition, auxiliary factors such as polypyrimidine tract-binding protein (PTB) and poly(rC)-binding protein (PCBP) have been described to interact with various picornavirus IRES elements

\* Corresponding author. Fax: +34 914974799.

E-mail address: [emartinez@cblm.uam.es](mailto:emartinez@cblm.uam.es) (E. Martínez-Salas).

(Luz and Beck, 1991; Stassinopoulos and Belsham, 2001; Walter et al., 1999). PTB and PCBP appear to facilitate IRES structural organization by acting as RNA chaperones (Gamarnik et al., 2000; Song et al., 2005).

The proteolytically processed forms of eIF4GI and eIF4GII have been shown to interact with the FMDV IRES and promote IRES-dependent initiation (Lopez de Quinto et al., 2001). As deduced from the efficiency of viral protein synthesis, the FMDV IRES is resistant to the general shutdown of translation initiation. However, whether other factors involved in cap-dependent translation initiation are processed during FMDV infection is still unknown.

Initiation of translation dependent on the IRES element is stimulated by the presence of its homologous 3'UTR sequence regardless of the poly(A)-dependent mechanism (Lopez de Quinto et al., 2002). We have recently shown that this enhancement is presumably due to IRES–3'UTR functional bridges. First, direct RNA–RNA interactions have been observed between the IRES element and the 3'UTR sequence in a poly(A)-independent manner (Serrano et al., 2006). Second, cellular proteins interacting with these regulatory regions may bridge the structural elements located at each end of the viral RNA. Changes in the composition of these RNA–protein complexes during the infection cycle, or the involvement of viral genome-encoded proteins have not been described previously.

Here we have taken advantage of the ability of FMDV RNA to interact with host proteins to analyze the composition of factors present in infected cells. For that purpose cytoplasmic extracts from infected cells were prepared for two genetically divergent FMDV isolates with different capacities to develop cytopathic effect (CPE) on susceptible cells. The results inferred from these studies were further confirmed by immune detection. We report here that several RNA-binding proteins including eIF3a, eIF3b, PABP, and PTB are processed during infection; proteolysis of these factors could contribute to explain the strong cap-dependent shutoff observed during FMDV infection.

## Results

### *PTB and two eIF3 subunits interacting with the IRES undergo proteolytic processing during FMDV infection*

In this work, we aimed to study the interaction of cytoplasmic proteins from infected cells with the viral IRES in order to monitor changes in the RNA-binding factors induced by FMDV infection. For that purpose BHK-21 cells were infected with two isolates belonging to serotypes C and O, which diverged in about 10% of their genome nucleotide sequence and showed significant differences in their viral cycle. The FMDV C-S8 isolate induced CPE and complete cell detachment around 4 h post-infection (p.i.); however, the O1K isolate induced cell detachment at later times p.i. Thus, for O1K isolate infections were stopped at early and late times, 3 and 5 h p.i., respectively, but C-S8 infection was stopped only at 4 h p.i. Additionally, EMCV infection was chosen as a control of picornavirus-infected cells.

Interaction of proteins from infected cells with the FMDV IRES probe is shown in Fig. 1. In comparison to uninfected BHK-21 cells, changes in the RNA protein-binding pattern could be clearly observed with S10 extracts from FMDV-infected cells. Four polypeptides of 220, 116, 80 and 57 kDa previously identified as eIF4G, eIF3b, eIF4B and PTB, respectively (Lopez de Quinto et al., 2001; Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000), were detected in BHK-21 mock-infected cells (Fig. 1). The product of 220 kDa disappeared in the extracts from FMDV-infected cells, and a new 110 kDa protein corresponding to the C-terminal end of eIF4G appeared, as expected from Lb-induced proteolysis (Devaney et al., 1988; Gradi et al., 2004; Lopez de Quinto et al., 2001; Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000). A marked decrease in p116 as infection proceeded was detected. As p116 became undetectable, two new proteins of about 110 and 64 kDa emerged. This shift in the binding pattern showed a gradual effect, as the three proteins, p116, p110 and p64, could be detected in extracts from cells collected at early times post-infection. A significant decrease in the intensity of p80 and p57 was detected with C-S8-infected cell extracts (Fig. 1). The later changes were not detected in the UV-crosslink pattern obtained with extracts prepared from EMCV-infected cells.

The expression of non-structural viral proteins in the infected cells was analysed by immunoblotting using equal amounts of total protein load per lane. Western blot analysis using antisera directed against FMDV 3C (Fig. 2A) and 3D proteins (Fig. 2B) confirmed the presence of 3Cpro and 3Dpol in the FMDV-infected cells. The intensity of the FMDV-encoded proteins increased significantly at late time post-infection in O1K. Additionally, accumulation of 3Cpro was more evident for C-S8 than for O1K infection. The increase in 3C and 3D proteins accumulation in the C-S8 isolate was presumably due to an advanced protein synthesis that correlated as well with the extent of CPE observed in the C-S8-infected monolayer. None of the sera recognized EMCV-encoded proteins specifically. As

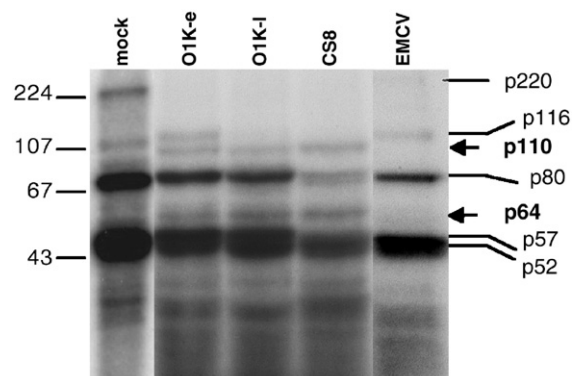


Fig. 1. Effect of FMDV infection on IRES–protein interactions. Autoradiogram of a UV-crosslink assay performed with IRES labelled probe (0.03 pmol) and 40 µg of S10 proteins, prepared from BHK-21 cells infected with FMDV O1K, or C-S8, respectively (O1K-e and O1K-l is used in all figures to denote early and late time post-infection). Mock-infected cells were used as controls. Proteins were resolved in a 10% SDS–PAGE. Arrows point to new polypeptides, p110 and p64, specifically detected in FMDV-infected cells, absent in the control mock-infected BHK-21.

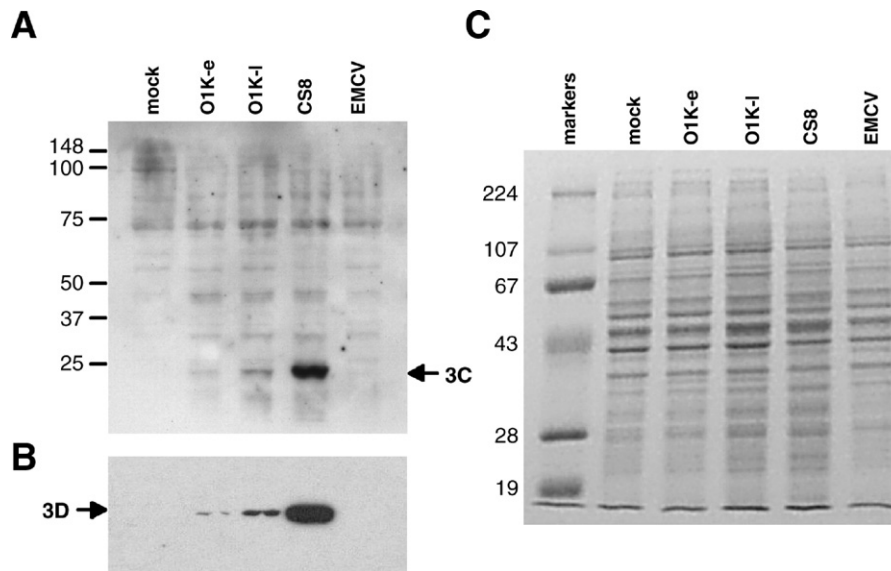


Fig. 2. Accumulation of viral non-structural proteins and total protein pattern during the course of FMDV infection. (A) Immunodetection of FMDV 3C protease and (B) 3D polymerase with specific FMDV sera in S10 extracts prepared from uninfected BHK-21, or cells infected with FMDV O1K, C-S8, or EMCV. (C) Coomassie blue staining of 10% SDS–PAGE gel loaded with equal amounts (10  $\mu$ g) of proteins of the corresponding S10 extracts. The Western blots were carried out with aliquots of same samples shown in (C), loaded in 12% SDS–PAGE gels.

shown in Fig. 2C, no relevant differences in protein loading could be detected in the pattern of total protein in extracts from infected and uninfected cells after PAGE fractionation and Coomassie blue staining.

In order to identify the host factors accounting for the shifted binding pattern shown in Fig. 1, we performed immunoblotting detection assays using sera directed against proteins known to bind the FMDV IRES element with sizes in the range of those predicted for the factors involved in the shift, p220 (eIF4G), p57 (PTB), and p116 (eIF3b) (Lopez de Quinto et al., 2001). Fig. 3A shows the results of a Western blot using a specific serum anti-eIF4G (Aragon et al., 2000). The product detected in UV-crosslinking assays as p220 contains two eIF4G isoforms, 4GI and 4GII. Both forms are cleaved by the viral Lb protease (Devaney et al., 1988; Gradi et al., 2004; Lopez de Quinto et al., 2001) concomitant with host cell protein synthesis inhibition. The C-terminal fragment of eIF4G is able to bind the IRES after cleavage and is detected as a p110 by UV-crosslinking using S10 extracts prepared from transfected cells expressing the Lb protease (Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000). Consistent with that, Fig. 3A shows the absence of detectable eIF4G (p220) in infected cells and the presence of a new protein of approximately 110 kDa (p110), presumably corresponding to the C-terminal fragment of eIF4G. The product of 110 kDa was absent in EMCV-infected cells used as a picornavirus infection control, as well as in the mock-infected control. Other differences in the pattern of proteins recognized by the eIF4G serum in extracts from FMDV-infected cells could be observed, as the new presence of p66, p60, p34 and p25. The last two polypeptides are unique to C-S8 infection, and presumably arose as secondary cleavages of the eIF4G carboxy-terminal product. The electrophoretic mobility of these polypeptides was different than the one reported for eIF4G cleavage products induced during

apoptosis (Marissen and Lloyd, 1998; Bushell et al., 2000; Clemens et al., 1998).

A decrease in the signal of PTB (p57) was also observed with extracts from C-S8-infected cells (Fig. 1). A strong decrease in

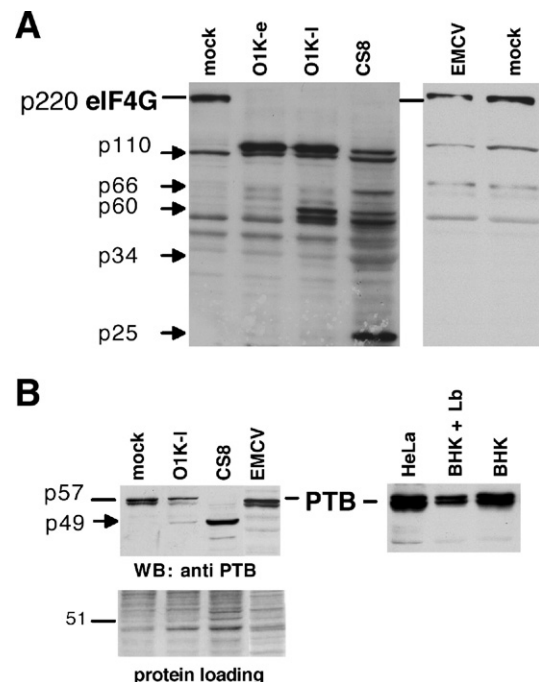


Fig. 3. Proteolysis of eIF4G and PTB in FMDV-infected cells. (A) Immunodetection of eIF4G in extracts from FMDV-infected cells. A specific anti-eIF4G serum was used to detect proteins present in extracts prepared from BHK-21 cells infected with the indicated viral isolates. Equal amounts of total proteins (10  $\mu$ g) was loaded per well in a 10% SDS–PAGE. (B) Immunodetection of PTB in FMDV-infected (left panel) or Lb-transfected (right panel) cells. An arrow denotes the presence of a new p49 peptide in infected cells. The lower panel shows the Coomassie blue staining of the gel.



the concentration of p57 in extracts infected with FMDV C-S8 was observed by immunodetection using a specific anti-PTB serum (Wagner and Garcia-Blanco, 2002), together with the appearance of a new protein (p49) specifically recognized by the antibody (Fig. 3B). For O1K-infected cells, the decrease was less pronounced and the new product became detectable as a faint band at late time p.i. No significant cleavage of PTB was observed in extracts from EMCV-infected cells. A protein loading control indicated no relevant differences between the extracts analyzed (Fig. 3B). Therefore, comparison of the Western blot pattern using anti-PTB serum and UV-crosslinking results showed a correlation in the decreased levels of PTB in FMDV-infected cells and the intensity of the crosslinked protein. In extracts from cells transfected with Lb plasmid expressing the C-S8 FMDV protease, unprocessed PTB was detected at lower levels than those found in uninfected cells (Fig. 3B). However, p49 detected in infected cells could not be detected in Lb-transfected extracts. These results suggest that PTB undergoes proteolytic modification upon FMDV infection and that Lb protease is partly involved in that cleavage event but does not account for the complete cleavage of PTB. Transfection assays carried out with a plasmid that expresses the FMDV C-S8 3C protease in a cap-dependent manner (Martinez-Salas and Domingo, 1995) in order to determine the involvement of this viral protease in the cleavage of the endogenous protein were below the level of detection of the cleavage product (data not shown).

Regarding the gradual decrease of p116 shown in Fig. 1, and on the basis of our previous identification of p116 (p116/110) interacting with the FMDV IRES as eIF3b/c (Lopez de Quinto et al., 2001) we examined the pattern of eIF3 in FMDV-infected cells. Immunodetection using a serum against eIF3 (Meyer et al., 1982) revealed differences in the number, size and intensity of the proteins recognized by the antibody in the different extracts (Fig. 4). Concerning p170, which was detected in mock-infected cells extracts, was absent in both C-S8 and O1K lysates; in addition, p150 and p116 were absent in C-S8 extracts. The polypeptide of 150 kDa corresponds to a breakdown product of eIF3a, frequently observed in crude cellular extracts (Johnson et al., 1997). Polypeptides p110,

p100, p90, p66, p36 and p30 were detected in both FMDV-infected cells, but p110 and p66 significantly increased in intensity in C-S8-infected cells, and two new proteins p50, p46 became specifically detectable in C-S8 lysates. EMCV infection induced weak break down of eIF3 subunits, which led to the detection of three polypeptides of 100, 90 and 66 kDa, similar to those observed in O1K at early time post-infection (Fig. 4).

Considering the results from UV-crosslinking and Western blot assays using extracts prepared from the different infected cells we conclude that the IRES region interacted with several host proteins proteolytically processed during the course of FMDV infection. These differential IRES–protein interactions in uninfected or in infected cells were specific and not due to major differences in the available proteins present in these cells. The appearance of new proteins in infected cells concomitant with the disappearance of others strongly suggested FMDV infection-induced proteolytic events as responsible for this shift. The positive reaction of six different polypeptides, p46, p50, p66, p90, p100 and p110, with anti-eIF3 serum together with the disappearance of p170 and p116 supported the hypothesis that FMDV was inducing the cleavage of two eIF3 subunits, a and b.

#### *Proteins p116, p70, and p47 interacting with the terminal ends of the viral RNA are processed during FMDV infection*

Proteins interacting with RNA probes corresponding to the 3' end as well as to the S region have been recently reported using BHK-21 extracts (Lopez de Quinto et al., 2002; Serrano et al., 2006). In order to study if FMDV infection induced changes in the interaction of cellular proteins with RNAs corresponding to the 5' and 3' ends of the viral genome, we carried out UV-crosslinking and Western blot assays using extracts from BHK-21 cells infected with C-S8 or O1K isolates, as described above for IRES RNA. As shown in Fig. 5A, two polypeptides, p116 and p47, were detected with 3'UTR  $\Delta$ (polyA) probe. The UV-crosslinking intensity of p116 decreased as FMDV infection progressed and became undetectable at late times post-infection. As p116 faded away two new proteins one of approximately 107 kDa and a second of 90 or 96 kDa for C-S8 and O1K, respectively, were detected. The later infection-specific products were undetected in the IRES interaction assay (Fig. 1). Concerning the second 3'UTR-binding protein, p47, the intensity of RNA-binding was lower in the case of infected cells extracts, particularly for C-S8 isolate (Figs. 5A and B).

The use of a complete 3'UTR probe also revealed the presence of a third polypeptide, p70 (Fig. 5B). We have recently identified p70 as PABP, a protein specifically interacting with the entire FMDV 3'UTR that carries a poly(A) tail (Saiz et al., 2001; Serrano et al., 2006). With the aim to analyze whether PABP was proteolyzed during FMDV infection, extracts from O1K- and C-S8-infected cells were used in a UV-crosslink assay with the entire 3'UTR probe. A moderate decrease in p70 binding was observed in C-S8 infection, unlike O1K (Fig. 5B). A Western blot with specific anti-PABP antibodies (Burgui et al., 2003) indicated the presence of p70 (PABP) in the uninfected BHK-21 extracts with the same mobility than in HeLa

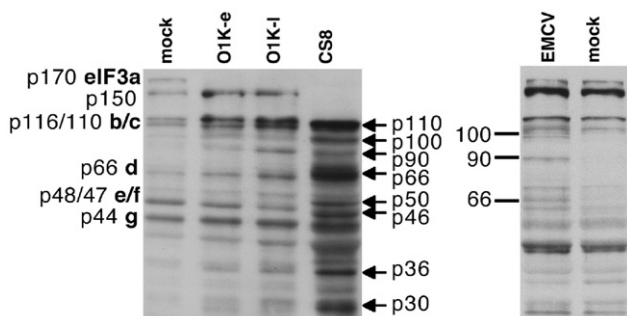


Fig. 4. Immunodetection of eIF3 translation initiation factor in FMDV-infected cells. Western blots carried out with protein extracts (10  $\mu$ g per lane) fractionated in a 10% PAGE prepared from BHK-21 cells infected with the indicated viral isolates, immunoblotted with serum against eIF3. The right panel shows the results obtained with EMCV-infected cells. Arrows depict new polypeptides arising in extracts prepared from infected cells.

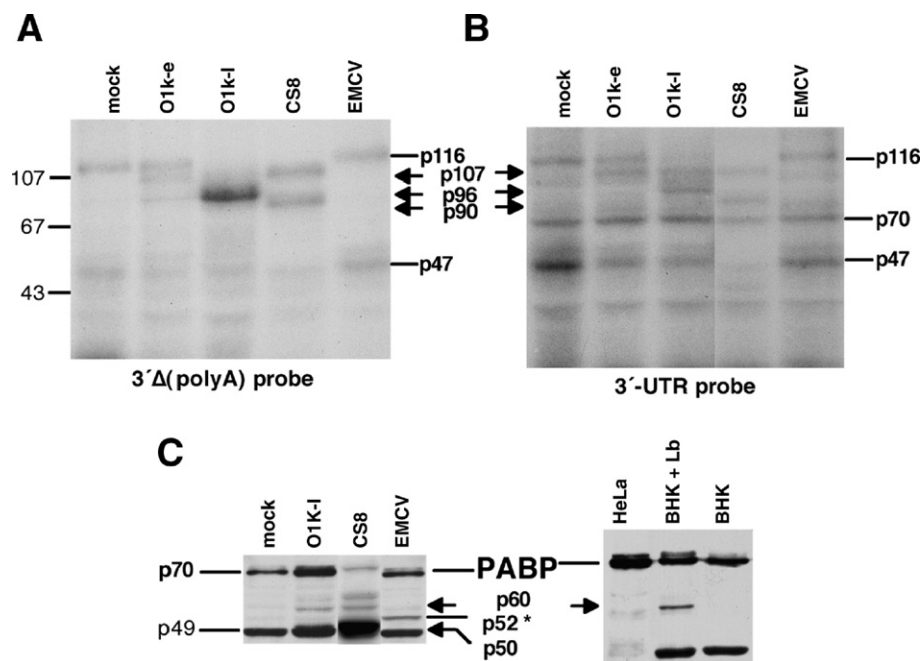


Fig. 5. RNA–protein interaction pattern of 3'UTR with infected cells reveals processing of p116 and p47. (A) UV-crosslink assay of 3'Δ(A) transcript, devoid of the poly(A) tail, carried out with extracts from infected cells. (B) RNA–protein interaction of the complete FMDV 3'UTR probe with infected cell lysates. Proteins were resolved in a 10% SDS–PAGE; arrows point to new polypeptides, specifically detected in infected cells. (C) Immunodetection of PABP in FMDV-infected and Lb-transfected cell extracts. Equal amounts of proteins (10 µg) were loaded per lane; arrows depict new polypeptides p60 and p50 specific of FMDV-infected or Lb-transfected cells. The asterisk in p52 marks a cleavage product specific of EMCV-infected cells.

cells; an unspecific product of about 49 kDa was recognised by the antibody in all extracts derived from BHK-21 cells. Partial cleavage of PABP was observed in C-S8-infected lysates, producing a polypeptide of about 60 kDa and a second product of 50 kDa that migrated close to the unspecific p49 (Fig. 5C). This effect was less pronounced in O1K-infected cells. The analysis of EMCV lysates was also indicative of a partial proteolytic activity on p70, generating a polypeptide of about 52 kDa. Notably, extracts prepared from Lb-transfected cells revealed the presence of p60 in the immunoblotting. These results demonstrated that PABP was proteolytically modified in infected cells and that Lb protease was in part responsible for

that cleavage event. As mentioned before for PTB cleavage, the involvement of 3C protease in the endogenous PABP processing could not be detected in transfected cells.

More pronounced changes in the binding pattern of proteins to the S region in the viral 5' end could be observed using S10 extracts from FMDV-infected cells (Fig. 6). The interaction of S probe with infected cells closely paralleled the effect seen with the 3'UTR probe (compare Figs. 5A, B with Fig. 6), in support of our previous results indicating that these two RNA regions bind a common host factor, p47. This protein had the same electrophoretic mobility than PCBP1-2 in a Western blot (Serrano et al., 2006). No relevant changes could be observed comparing the binding patterns of proteins from uninfected and EMCV-infected cells to 3'UTR and S FMDV RNA probes.

In summary, our results indicate that eIF3a,b, PABP and PTB cleavage events, in addition to eIF4G, are specifically induced by FMDV infection.

## Discussion

Translation of viral-encoded proteins during FMDV infection is a very efficient process that lasts to the end of the infection cycle, concomitantly with a strong inhibition of cellular protein synthesis (Belsham et al., 2000). Efficient performance of the FMDV IRES is therefore required in order to ensure enough viral protein accumulation to accomplish high-titre plaque-forming unit production. Here we have used extracts prepared from BHK-21-infected cells to monitor RNA–protein interaction of host factors with the FMDV IRES. We have found specific cleavage of several IRES-

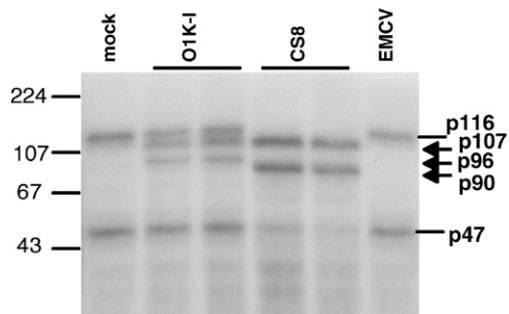


Fig. 6. Effect of FMDV infection on the interaction of the S region with proteins. UV-crosslink reaction with a probe encompassing the S region of the FMDV genome and duplicate samples of extracts from O1K- and C-S8-infected cells. Proteins were resolved in a 12% SDS–PAGE. Interaction of p116 with the S region reveals a similar pattern of processing in infected cells than the 3'UTR probe. Arrows depict RNA-crosslinked polypeptides specifically detected in infected cells.

binding proteins, namely PTB, and two polypeptides of eIF3, in comparison to uninfected cells. Partial cleavage of PABP, a protein that interacts with the 3' end of the viral RNA, was also detected. In this case, unlike PTB, infection with EMCV also evidenced proteolysis of the protein. In agreement with previous results, eIF4G was cleaved at early times post-infection.

Cleavage of eIF3a-b, PABP and PTB in FMDV-infected cells described here represents a novel finding. This processing, in addition to that of eIF4G cleavage, may contribute to the host translation shutdown in FMDV-infected cells. eIF3a and b, belong to the group of proteins that are essential to assemble the 48S initiation complexes on the host mRNAs (Hinnebusch, 2006), which are for the most part polyadenylated and use a cap-dependent mechanism of translation initiation. In this regard, the cleavage products of eIF3a induced by the 20S proteasome were shown to be inhibitory for 48S complex assembly on the capped B-globin mRNA in a reconstitution assay (Baugh and Pilipenko, 2004). On the other hand, cleavage of both eIF4G and PABP in FMDV-infected cells would disrupt the functional bridge that connects the 3' end of the host polyadenylated mRNAs with the 5' cap, via the trimeric eIF4F complex, composed of eIF4G, eIF4E and eIF4A (Gebauer and Hentze, 2004; Lloyd, 2006). Interestingly, the carboxy-terminal end of eIF4G produced after Lb cleavage is needed for FMDV IRES activity (Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000), allowing to maintain high IRES activity. Whether this also applies to eIF3 cleavage products needs to be investigated further.

We have also observed a reduction in the intensity of p47, presumably PCBP1-2, a protein which has been shown previously to interact with picornavirus RNA ends (Gamarnik and Andino, 2000; Walter et al., 1999). Two proteins, p116 and p47, which interact with the FMDV RNA genome at the 5' and 3' ends (Serrano et al., 2006), decreased during infection. Conversely, three new products, p107, p90 or p96, were specifically detected in infected cells with S and 3'UTR probes, but not with the IRES probe. Whether any of these products are involved in stimulation or repression of translation or replication of the viral RNA, as well as their identification needs further investigation. Direct detection of FMDV-encoded proteins with specific antibodies in the extracts used for binding assays showed the presence of non-structural proteins 3D (p52) and 3C (p22), as expected. However, we failed to detect either 3D or 3CD in the protein complexes bound to the 3'UTR and S FMDV probes (data not shown).

Modification of the eIF4F complex in several picornavirus-infected cells has been described (Lloyd, 2006). However, no information was available regarding the integrity of eIF3 polypeptides in FMDV-infected cells. The initiation factor eIF3 is composed of 13 subunits known as eIF3a to eIF3m (Hinnebusch, 2006); interaction of eIF3e with eIF4G provides the link between ribosomal subunits and mRNAs already bound to eIF4F (LeFebvre et al., 2006). During apoptosis, translation initiation is reduced due to caspase cleavage of factors required for the cap-dependent mechanism, eIF4G and PABP (Bushell et al., 2000, 2001; Clemens et al., 1998; Marissen and Lloyd,

1998). Under these circumstances, many proteins that are required for apoptosis are instead translated by the alternative method of internal ribosome entry (Spriggs et al., 2005). It was also recently reported that 20S proteasome differentially alters translation via eIF4G and eIF3a cleavage (Baugh and Pilipenko, 2004). Proteasome-induced cleavage of eIF3a (p170) generated products of 128, 122 and 54 kDa, of different apparent mobility than those described here for FMDV-infected cells.

Our results also showed proteolytic cleavage of two RNA-binding proteins, PTB and PABP during FMDV infection. At late time post-infection with C-S8 isolate, when CPE is almost complete, low amounts of unprocessed PTB were detected. In contrast, extracts prepared from late infection with O1K still retained about 50% of the intact protein. The cleavage product that appears in FMDV-infected cells, p49, differs from that described to occur during apoptosis (Back et al., 2002b). Cleavage of PTB is not expected to alter cap-dependent translation initiation, but it can compromise IRES-driven translation since this protein interacts with the FMDV IRES (Luz and Beck, 1991; Pilipenko et al., 2000). In this regard, the PTB fragments generated in poliovirus infection inhibit IRES-dependent translation (Back et al., 2002a). However, at the late stages of the FMDV infection cycle, when PTB is cleaved, most of viral RNA is already encapsidated.

The cytopathic effect induced by these two different FMDV isolates may be related to the extent of processing of specific host proteins. Cleavage of PABP was also more pronounced in C-S8-infected cell lysates than in O1K. This effect was presumably due to Lb protease activity, as demonstrated by the presence of a cleavage product of the same mobility in FMDV Lb-transfected cells. Partial processing of PABP was previously observed in poliovirus (PV) infection (Back et al., 2002a; Kuyumcu-Martinez et al., 2002). PV infection causes a rapid inhibition of host cell protein synthesis while allowing IRES-dependent translation of its genomic RNA. PV 3C protease generates three of the four PABP cleavage products. However, at times when cap-dependent translation is inhibited during infection, only 30% of the total cellular PABP is cleaved (Kuyumcu-Martinez et al., 2004). Similarly, infection by another enterovirus, Coxsackie B virus (CBV) resulted in cleavage of eIF4G and PABP (Kerekatte et al., 1999; Lerner and Nicchitta, 2006), coincident with polyribosome breakdown in the cytosol and ER compartments (Lerner and Nicchitta, 2006).

Enhancement of mRNA translation initiation by the 3' poly (A) tail is mediated through interaction of PABP with eIF4G, bridging the 5' terminal cap structure (Gebauer and Hentze, 2004). Interaction of the FMDV-3'UTR with PABP was recently demonstrated (Serrano et al., 2006). However, stimulation of FMDV IRES in Lb protease-transfected cells is achieved by the 90 nt heteropolymeric region (Lopez de Quinto et al., 2002), and thus impairment of PABP may specifically shutdown cap-dependent initiation without a significant effect on internal initiation. In the case of hepatitis C virus (HCV) IRES-dependent translation, analysis of post-initiation events revealed that the 3' poly(A) tract and HCV 3'UTR improve translation efficiency by enabling termination and possibly



ribosome recycling for successive rounds of translation (Bradrick et al., 2006).

Despite the processing of the RNA-binding factors described above, the general pattern of host factors analyzed by direct staining of total proteins did not indicate a generalized proteolytic cleavage at late times post-infection with the C-S8 isolate. In summary, we have found evidence of proteolytic processing of PTB and two eIF3 subunits, a and b, as well as partial cleavage of PABP during the course of FMDV infection. The role of these events on the viral cycle remains to be addressed and will be the focus of future studies.

## Materials and methods

### *Infections, transfections, and cell extract preparation*

BHK-21 cells were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% foetal bovine serum. FMDV isolates of two different serotypes were used for infection of BHK-21 monolayers at a multiplicity of infection (MOI) of 5. After 1 h of adsorption infection was left to proceed for complete CPE. After 3 h post-infection (h p.i.) cells infected with type C, C-S8 isolate, began to detach rapidly and at 5 h p.i. there were very few cells attached to the plates (about 5%). So we considered as late time 4 h p.i. For type O, O1K isolate, cell detachment progressed more slowly, with most cells still attached at 5 h p.i. though showing obvious CPE. For that reason infection with O1K was stopped at two different times p.i. late, 5 h p.i. (O1K-l), and early, 3 h p.i. (O1K-e).

HeLa or BHK-21 cells infected with EMCV using a MOI of 5 were scraped 4 h p.i. prior cell detachment (Gingras et al., 1996; Rosas et al., 2003). BHK-21 and HeLa cells infected with FMDV or EMCV as indicated above, grown in 10-cm dishes in 5% calf serum supplemented DMEM, were scraped, collected by centrifugation and processed for S10 cell extract preparation as described previously (Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000). The total protein concentration in the extract was measured by the Bradford assay prior to any further use.

For FMDV Lb protease processed cell extracts, BHK-21 monolayers were infected with VT7F-3 1 h prior to transfection with pLb plasmid (Martinez-Salas et al., 1993) using cationic lipids. At 20 h posttransfection cells were washed twice with cold phosphate buffer saline, collected and processed for S10 cell extract preparation (Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000). Following elimination of cellular debris, the extract was incubated at room temperature for 5–10 min to allow Lb protease-induced cleavage of proteins present in untransfected cells. Total protein concentration was measured by the Bradford assay.

### *RNA synthesis*

Plasmids encoding the IRES, the S region and the 3'UTR of FMDV RNA have been described (Fernandez-Miragall et al., 2006; Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000; Serrano et al., 2006). Prior to RNA synthesis, plasmids were linearized using *NotI* to generate S and 3'UTR transcripts, and *XhoI* for

the IRES transcript. To synthesize the transcript 3'UTR  $\Delta(A)$ , lacking the 58 nt poly(A) tail, the corresponding plasmid was linearized with *EcoRV* (Saiz et al., 2001). Transcription was performed for 1 h at 37 °C using 50 U of T3 or T7 RNA polymerase in the presence of 0.5 to 1  $\mu$ g of linearized DNA template, 50 mM DTT, 0.5 mM rNTPs and 20 U of RNasin.

When needed, RNA transcripts were uniformly labelled using [ $\alpha^{32}$ P]CTP (400 Ci/mmol) as described (Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000). Reactions were incubated for 15 min with 1 U of RQ1 DNase and unincorporated isotope eliminated in MicroSpin G-50 columns.

### *RNA–protein interaction assays*

UV-crosslinking assays were performed using 40  $\mu$ g of proteins present in S10 extracts and 0.03 pmol of the specific  $^{32}$ P-labelled RNA as described (Lopez de Quinto et al., 2001). In all cases, the RNA–protein mixture was digested with an excess of RNase A during 30 min at 37 °C, followed by addition of SDS-loading buffer, heating 2 min at 95 °C, and electrophoresed through SDS–polyacrylamide gels. Dried gels were used to visualize the  $^{32}$ P-crosslinked proteins by autoradiography. Unrelated probes did not yield the same UV-crosslink pattern.

Immunodetection of the proteins of interest was assessed in Western blot assays, carried out as described (Lopez de Quinto et al., 2001). Following electrophoresis separation, proteins were transferred to PVDF membranes (Biorad), using a semidry electrotransfer device. Identification of the RNA-crosslinked proteins was performed with specific polyclonal antibodies at 1:2000 dilution:  $\alpha$ -Ct eIF4GI (Aragon et al., 2000),  $\alpha$ -eIF3 (Meyer et al., 1982),  $\alpha$ -PABP (Burgui et al., 2003), and  $\alpha$ -PTB (Wagner and Garcia-Blanco, 2002), followed by the appropriate secondary HRP-conjugated antibody and ECL detection (SuperSignal west-Dura, Pierce). Monoclonal antibodies 2D2 (Garcia-Briones et al., 2006) and 3F12 elicited against viral proteins 3C and 3D, respectively, kindly provided by E. Brocchi were used at 1:2000 dilution. The same membrane was probed with the different sera after previous stripping of antibodies using Restore Western blot stripping buffer (Pierce) as recommended by the manufacturer.

## Acknowledgments

We are grateful to Drs. A. Nieto, M.G. Blanco, J.W. Hershey and E. Brocchi for anti-PABP, PTB, eIF3 and FMDV 3C, 3D antibodies, respectively. M. Sáiz is holder of a grant from “Programa Ramón y Cajal” from the Spanish Ministry of Education and Science.

This work was supported by grant BFU2005-00948 to EMS, RTA03-201 to MS, and by an Institutional grant from Fundación Ramón Areces.

## References

- Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J., Nieto, A., 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1



- protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* 20 (17), 6259–6268.
- Back, S.H., Kim, Y.K., Kim, W.J., Cho, S., Oh, H.R., Kim, J.E., Jang, S.K., 2002a. Translation of polioviral mRNA is inhibited by cleavage of polypyrimidine tract-binding proteins executed by polioviral 3C(pro). *J. Virol.* 76 (5), 2529–2542.
- Back, S.H., Shin, S., Jang, S.K., 2002b. Polypyrimidine tract-binding proteins are cleaved by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277 (30), 27200–27209.
- Baird, S.D., Turcotte, M., Korneluk, R.G., Holcik, M., 2006. Searching for IRES. *RNA* 12 (10), 1755–1785.
- Baugh, J.M., Pilipenko, E.V., 2004. 20S proteasome differentially alters translation of different mRNAs via the cleavage of eIF4F and eIF3. *Mol. Cell* 16 (4), 575–586.
- Belsham, G.J., Brangwyn, J.K., 1990. A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J. Virol.* 64 (11), 5389–5395.
- Belsham, G.J., McInerney, G.M., Ross-Smith, N., 2000. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J. Virol.* 74 (1), 272–280.
- Bradrick, S.S., Walters, R.W., Gromeier, M., 2006. The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res.* 34 (4), 1293–1303.
- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J., Nieto, A., 2003. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt. 12), 3263–3274.
- Bushell, M., Poncet, D., Marissen, W.E., Flotow, H., Lloyd, R.E., Clemens, M.J., Morley, S.J., 2000. Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage. *Cell Death Differ.* 7 (7), 628–636.
- Bushell, M., Wood, W., Carpenter, G., Pain, V.M., Morley, S.J., Clemens, M.J., 2001. Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *J. Biol. Chem.* 276 (26), 23922–23928.
- Clemens, M.J., Bushell, M., Morley, S.J., 1998. Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* 17 (22), 2921–2931.
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E., Grubman, M.J., 1988. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* 62 (11), 4407–4409.
- Fernandez-Miragall, O., Ramos, R., Ramajo, J., Martinez-Salas, E., 2006. Evidence of reciprocal tertiary interactions between conserved motifs involved in organizing RNA structure essential for internal initiation of translation. *RNA* 12 (2), 223–234.
- Gamarnik, A.V., Andino, R., 2000. Interactions of viral protein 3CD and poly (rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J. Virol.* 74 (5), 2219–2226.
- Gamarnik, A.V., Boddeker, N., Andino, R., 2000. Translation and replication of human rhinovirus type 14 and mengovirus in *Xenopus* oocytes. *J. Virol.* 74 (24), 11983–11987.
- García-Briones, M., Rosas, M.F., Gonzalez-Magaldi, M., Martín-Acebes, M.A., Sobrino, F., Armas-Portela, R., 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* 349 (2), 409–421.
- Gebauer, F., Hentze, M.W., 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 5 (10), 827–835.
- Gingras, A.C., Svitkin, Y., Belsham, G.J., Pause, A., Sonenberg, N., 1996. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (11), 5578–5583.
- Gradi, A., Foeger, N., Strong, R., Svitkin, Y.V., Sonenberg, N., Skern, T., Belsham, G.J., 2004. Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. *J. Virol.* 78 (7), 3271–3278.
- Hellen, C.U., Sarnow, P., 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15 (13), 1593–1612.
- Hinnebusch, A.G., 2006. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* 31 (10), 553–562.
- Johnson, K.R., Merrick, W.C., Zoll, W.L., Zhu, Y., 1997. Identification of cDNA clones for the large subunit of eukaryotic translation initiation factor: 3. Comparison of homologues from human, *Nicotiana tabacum*, *Caenorhabditis elegans*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272 (11), 7106–7113.
- Kerekatte, V., Keiper, B.D., Badorff, C., Cai, A., Knowlton, K.U., Rhoads, R.E., 1999. Cleavage of poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J. Virol.* 73 (1), 709–717.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Joachims, M., Lloyd, R.E., 2002. Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J. Virol.* 76 (5), 2062–2074.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Van Eden, M.E., Younan, P., Lloyd, R.E., 2004. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell. Biol.* 24 (4), 1779–1790.
- LeFebvre, A.K., Korneeva, N.L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R.D., Bradley, C.A., Hershey, J.W., Rhoads, R.E., 2006. Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J. Biol. Chem.* 281 (32), 22917–22932.
- Lerner, R.S., Nicchitta, C.V., 2006. mRNA translation is compartmentalized to the endoplasmic reticulum following physiological inhibition of cap-dependent translation. *RNA* 12 (5), 775–789.
- Li, W., Ross-Smith, N., Proud, C.G., Belsham, G.J., 2001. Cleavage of translation initiation factor 4AI (eIF4AI) but not eIF4AII by foot-and-mouth disease virus 3C protease: identification of the eIF4AI cleavage site. *FEBS Lett.* 507 (1), 1–5.
- Lloyd, R.E., 2006. Translational control by viral proteinases. *Virus Res.* 119 (1), 76–88.
- Lopez de Quinto, S., Martinez-Salas, E., 1999. Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology* 255 (2), 324–336.
- Lopez de Quinto, S., Martinez-Salas, E., 2000. Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* 6 (10), 1380–1392.
- Lopez de Quinto, S., Lafuente, E., Martinez-Salas, E., 2001. IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* 7 (9), 1213–1226.
- Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F., Martinez-Salas, E., 2002. IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res.* 30 (20), 4398–4405.
- Luz, N., Beck, E., 1991. Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 65 (12), 6486–6494.
- Marissen, W.E., Lloyd, R.E., 1998. Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Mol. Cell. Biol.* 18 (12), 7565–7574.
- Martinez-Salas, E., Domingo, E., 1995. Effect of expression of the aphthovirus protease 3C on viral infection and gene expression. *Virology* 212 (1), 111–120.
- Martinez-Salas, E., Saiz, J.C., Davila, M., Belsham, G.J., Domingo, E., 1993. A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J. Virol.* 67 (7), 3748–3755.
- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E., Lopez de Quinto, S., 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J. Gen. Virol.* 82 (Pt. 5), 973–984.
- Mason, P.W., Grubman, M.J., Baxt, B., 2003. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res.* 91 (1), 9–32.
- Meyer, L.J., Milburn, S.C., Hershey, J.W., 1982. Immunochemical characterization of mammalian protein synthesis initiation factors. *Biochemistry* 21 (18), 4206–4212.
- Pestova, T.V., Hellen, C.U., Shatsky, I.N., 1996. Canonical eukaryotic initiation

- factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol. Cell. Biol.* 16 (12), 6859–6869.
- Pilipenko, E.V., Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Khitrina, E.V., Poperechnaya, A.N., Agol, V.I., Hellen, C.U., 2000. A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev.* 14 (16), 2028–2045.
- Rosas, M.F., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., 2003. Stable expression of antisense RNAs targeted to the 5' non-coding region confers heterotypic inhibition to foot-and-mouth disease virus infection. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt. 2), 393–402.
- Ryan, M.D., Belsham, G.J., King, A.M., 1989. Specificity of enzyme–substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Virology* 173 (1), 35–45.
- Saiz, M., Gomez, S., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., 2001. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J. Gen. Virol.* 82 (Pt. 1), 93–101.
- Sarnow, P., 2003. Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome–RNA complexes and roles in viral pathogenesis. *J. Virol.* 77 (5), 2801–2806.
- Serrano, P., Pulido, M.R., Saiz, M., Martínez-Salas, E., 2006. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA–RNA interactions with the 5' end region. *J. Gen. Virol.* 87 (Pt. 10), 3013–3022.
- Song, Y., Tzima, E., Ochs, K., Bassili, G., Trusheim, H., Linder, M., Preissner, K.T., Niepmann, M., 2005. Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* 11 (12), 1809–1824.
- Spriggs, K.A., Bushell, M., Mitchell, S.A., Willis, A.E., 2005. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-*trans*-acting factors. *Cell Death Differ.* 12 (6), 585–591.
- Stassinopoulos, I.A., Belsham, G.J., 2001. A novel protein–RNA binding assay: functional interactions of the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site with cellular proteins. *RNA* 7 (1), 114–122.
- Strong, R., Belsham, G.J., 2004. Sequential modification of translation initiation factor eIF4GI by two different foot-and-mouth disease virus proteases within infected baby hamster kidney cells: identification of the 3Cpro cleavage site. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt. 10), 2953–2962.
- Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A., 2002. RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. *Mol. Cell* 10 (4), 943–949.
- Walter, B.L., Nguyen, J.H., Ehrenfeld, E., Semler, B.L., 1999. Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements. *RNA* 5 (12), 1570–1585.

# Tolerance to mutations in the foot-and-mouth disease virus integrin-binding RGD region is different in cultured cells and *in vivo* and depends on the capsid sequence context

Mónica Gutiérrez-Rivas,<sup>1,2</sup> Miguel Rodríguez Pulido,<sup>1,2</sup> Eric Baranowski,<sup>3,4</sup> Francisco Sobrino<sup>1,2</sup> and Margarita Sáiz<sup>1,2</sup>

## Correspondence

Margarita Sáiz  
msaiz@cbm.uam.es

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

<sup>3</sup>INRA, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France

<sup>4</sup>Université de Toulouse, ENVT, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France

Engineered RNAs carrying substitutions in the integrin receptor-binding Arg-Gly-Asp (RGD) region of foot-and-mouth disease virus (FMDV) were constructed (aa 141–147 of VP1 capsid protein) and their infectivity was assayed in cultured cells and suckling mice. The effect of these changes was studied in the capsid proteins of two FMDVs, C-S8c1, which enters cells through integrins, and 213hs<sup>−</sup>, a derivative highly adapted to cell culture whose ability to infect cells using the glycosaminoglycan heparan sulfate (HS) as receptor, acquired by multiple passage on BHK-21 cells, has been abolished. The capsid sequence context determined infectivity in cultured cells and directed the selection of additional replacements in structural proteins. Interestingly, a viral population derived from a C-S8c1/L144A mutant, carrying only three substitutions in the capsid, was able to expand tropism to wild-type (wt) and mutant (mt) glycosaminoglycan-deficient CHO cells. In contrast, the 213hs<sup>−</sup> capsid tolerated all substitutions analysed with no additional mutations, and the viruses recovered maintained the ability of the 213hs<sup>−</sup> parental virus to infect wt and mt CHO cells. Viruses derived from C-S8c1 with atypical RGD regions were virulent and transmissible for mice with no other changes in the capsid. Substitution of Asp143 for Ala in the C-S8c1 capsid eliminated infectivity in cultured cells and mice. Co-inoculation with a neutralizing monoclonal antibody directed against the type C FMDV RGD region abolished infectivity of C-S8c1 virus on suckling mice, suggesting that FMDV can infect mice using integrins. Sequence requirements imposed for viral entry *in vitro* and *in vivo* are discussed.

Received 21 April 2008

Accepted 18 June 2008

## INTRODUCTION

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a member of the family *Picornaviridae* and is the aetiological agent of a highly contagious and severe disease of cloven-hoofed animals (Domingo *et al.*, 1990; Pereira, 1981; Sáiz *et al.*, 2002). The mature virus particle consists of a non-enveloped icosahedral capsid enclosing a single-stranded, positive-sense RNA genome of about 8.5 kb. The capsid is composed of 60 copies of four virus-encoded structural proteins, VP1–VP4. A major structural feature of the outer capsid surface of the virion is a long and exposed flexible loop, the G–H loop of VP1, which includes a widely conserved Arg-Gly-Asp (RGD) motif (Acharya *et al.*, 1989; Fry *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 1993). This loop is highly

immunogenic and constitutes one of the major antigenic sites of FMDV involved in neutralization of viral infectivity (Mateu & Verdager, 2004).

The FMDV RGD motif mediates interaction with RGD-dependent integrins including  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_6$  and  $\alpha_v\beta_8$  used as receptors to initiate infection on cultured cells (Berinstein *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 2000b, 2002, 2004; Neff *et al.*, 2000). Genetically engineered viruses unable to infect cultured cells or cause disease in susceptible animals, carrying deletions or mutations in the RGD motif, have been reported extensively (Leippert *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 1994; McKenna *et al.*, 1995; Rieder *et al.*, 1996). Differences in the integrin-binding specificity have been found for FMDV serotypes (Duque & Baxt, 2003), and the involvement of the G–H loop residues in infectivity has been analysed (Mateu *et al.*, 1996). The sequence requirements for interaction with different integrins have been

The sequences of the oligonucleotides used in this study are available with the online version of this paper.

studied using purified human and bovine integrins (Duque *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 1997, 2000a), as well as transfected cell lines expressing specific integrins (Burman *et al.*, 2006; Dicara *et al.*, 2008; Duque & Baxt, 2003; Jackson *et al.*, 2000b; Rieder *et al.*, 2005).

The high potential of FMDV for variation and adaptation may lead to modifications affecting receptor usage, tropism and antigenic diversity (Domingo *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2003; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2004). Adaptation of FMDV to cell culture can result in selection of variants that use the glycosaminoglycan heparan sulfate (HS) as receptor (Jackson *et al.*, 1996; Sa-Carvalho *et al.*, 1997). RGD replacements, such as RGG, RED and GGG, or the exchange of 8 aa spanning the RGD motif for the FLAG peptide sequence DYKDDDDK, yielded infectious viruses only in the context of variants highly passaged on cell culture (Baranowski *et al.*, 2000, 2001; Martínez *et al.*, 1997; Ruiz-Jarabo *et al.*, 1999). Additionally, after multiple cytolitic passages, FMDV isolate C-S8c1 acquired substitutions in the capsid that increased infectivity on BHK-21 cells and allowed infection of mutant glycosaminoglycan-deficient CHO cells in an HS-independent pathway. RGD replacements in these viruses did not affect infectivity on BHK-21 and CHO cells, suggesting the involvement of an alternative mechanism of entry independent of RGD and HS (Baranowski *et al.*, 1998, 2000).

Information currently available indicates that FMDV utilizes integrins for entry in the natural host, and there is no evidence of the use of alternative receptors *in vivo* (McKenna *et al.*, 1995; Neff *et al.*, 1998). However, the role of the different integrin receptors on viral tissue tropism and pathogenesis has not yet been established, and changes in receptor specificity may also occur during FMDV replication *in vivo*. Amino acid substitutions affecting the RGD motif (R141G) or positions +1 and +4 (L144P and L147P) have been selected in viruses escaping an immune response to synthetic peptides in vaccinated cattle (Taboga *et al.*, 1997; Tami *et al.*, 2003), and in a C-S8c1 virus adapted to guinea pig (Núñez *et al.*, 2001). Moreover, an engineered chimeric virus carrying KGE instead of RGD on a type O capsid sequence was able to replicate and cause mild disease in pigs (Zhao *et al.*, 2003).

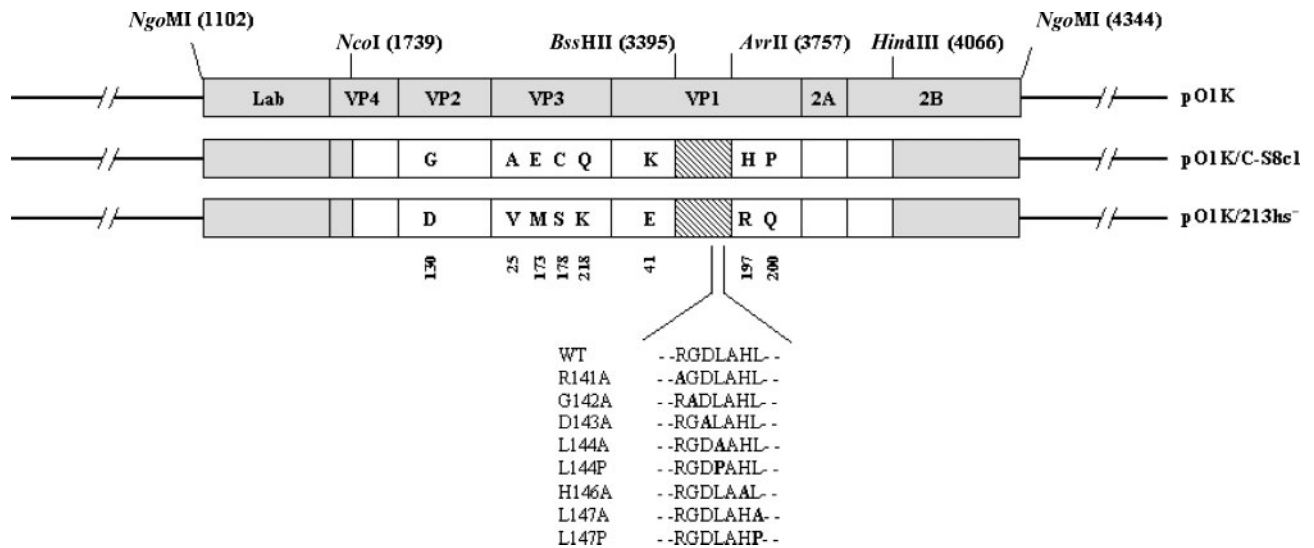
Adult mice are not among the natural hosts of FMDV, but during the first weeks of life, mice are susceptible to inoculation of virus particles and viral RNA, inducing a rapid disease with tremors, ataxia, paralysis of the hind limbs and death (Baranowski *et al.*, 2003; Skinner, 1951). The murine model has been characterized and used extensively for FMDV vaccine development and immunization studies, showing that the virus can replicate upon experimental inoculation for up to 12–72 h post-inoculation and is subsequently cleared by the adaptive immune response (Fernández *et al.*, 1986). Recently, we have shown that the RGD mutant L147P is unable to grow in cell culture. However, it can be lethal and transmissible in

suckling mice when inoculated as *in vitro*-transcribed RNA derived from an FMDV infectious clone (Baranowski *et al.*, 2003). In this study, we analysed the effect of amino acid substitutions in the RGD region within two different capsid contexts: the C-S8c1 isolate and a second isolate corresponding to virus recovered after multiple passages of C-S8c1 in BHK-21 cells, which was negatively selected for binding to heparin (isolate 213hs<sup>−</sup>). The viability of the resultant mutants was assayed *in vitro* on cultured cells, as well as in suckling mice by *in vivo* transfection of the corresponding RNA transcripts. Our work provides new data on how sequence changes in the RGD region can affect virulence in suckling mice and infection of cultured cells in two different FMDV capsid sequence contexts resembling field isolates and virus adapted to cell culture, respectively.

## METHODS

**Mutagenesis and construction of plasmids.** Amino acid substitutions in the RGD region were introduced into the VP1 capsid proteins of two different FMDV viruses (Fig. 1). C-S8c1 is a plaque-purified clone from natural isolate C-Sta Pau Sp/70 (Sobrinho *et al.*, 1983). The 213hs<sup>−</sup> capsid sequence corresponds to MARLS<sup>−</sup> virus, a monoclonal antibody (mAb)-resistant mutant isolated with mAb SD6 from C-S8c1 virus after 213 passages on BHK-21 cells and following negative heparin-binding selection (Baranowski *et al.*, 1998). Site-directed mutagenesis was carried out using p3242/C-S8c1 (Baranowski *et al.*, 1998) as template for the PCR. Supplementary Table S1 (available in JGV Online) shows the oligonucleotides used to introduce specific mutations. PCR fragments were digested with BssHII and AvrII (hatched boxes in Fig. 1) and ligated into p3242/C-S8c1 and p3242/213hs<sup>−</sup>, previously digested with the same enzymes. Plasmid p3242/213hs<sup>−</sup> was generated by exchange of the *Sfi*–BssHII fragment (nt 2827–3395) carrying mutation K173M in the VP3 protein, conferring the negative heparin-binding phenotype in MARLS virus (Baranowski *et al.*, 1998), with the corresponding fragment in plasmid p3242/213 (Baranowski *et al.*, 1998, 2000); to generate this construct, PCR was performed using p3242/213 as template and the primers listed in Supplementary Table S1. Finally, full-length cDNAs carrying mutations in VP1 were constructed by inserting the corresponding *Ngo*MI fragments from derivatives p3242/C-S8c1 and p3242/213hs<sup>−</sup> into the *Ngo*MI site of plasmid pO1KA3242 (Baranowski *et al.*, 1998).

***In vitro* transcription and transfection.** Plasmids were linearized by digestion with *Hpa*I and transcripts were generated using SP6 RNA polymerase (Promega). After transcription, reaction mixtures were treated with 1 U RQ1 DNase ( $\mu$ g RNA)<sup>−1</sup> (Promega). The RNA concentration was estimated by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, and transcripts were used for infectivity assays in mice and cell culture. Semi-confluent monolayers of BHK-21 cells ( $\sim 5 \times 10^6$ ), grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 5% fetal calf serum (Gibco), were transfected with 5–10  $\mu$ g RNA using Lipofectin (Invitrogen) (Sáiz *et al.*, 2001). After transfection, cells were incubated at 37 °C for up to 6 days until cytopathic effect (CPE) development. Aliquots of 100  $\mu$ l of each transfection medium were used to infect approximately  $2.5 \times 10^6$  fresh BHK-21 cells and wild-type (wt) and mutant (mt) glycosaminoglycan-deficient pgsA-745 CHO cells. Total RNA was phenol/chloroform extracted from supernatants of transfected or infected cells for RT-PCR amplification and subsequent sequencing of



**Fig. 1.** Schematic representation of FMDV full-length clones carrying amino acid substitutions in the RGD region. Restriction sites used for mutagenesis are indicated on the pO1K plasmid. Oligonucleotides used to introduce the specific mutations are listed in Supplementary Table S1. C-S8c1 genomic regions are represented by open boxes. Hatched boxes indicate the recombinant PCR fragments inserted, with the mutations listed below. Differences in the amino acid sequences of the chimeric genomes containing capsids from C-S8c1 or 213hs<sup>-</sup> virus, respectively, are indicated. Nucleotide numbering is as given by Escarmis *et al.* (1996).

the 2067 bp cDNA fragment corresponding to the capsid genes VP2–VP1 (Baranowski *et al.*, 2003).

**Heparin-binding assay.** Binding to heparin was determined using Sepharose CL-6B beads (Pharmacia Biotech) as described previously (Baranowski *et al.*, 1998). Briefly, binding was estimated as the ratio of p.f.u. remaining in the supernatant of serial dilutions of a viral suspension after incubation with control beads relative to heparin–Sepharose beads where a ratio of 2 was taken as the limit of positive detection and ~1 indicated no detectable binding.

**Virulence assay on suckling mice.** Groups of suckling Swiss mice of about 1 week old were inoculated intraperitoneally with 100 µl of different amounts of RNA diluted in PBS containing 20 µg Lipofectin (Gibco), as described previously (Baranowski *et al.*, 2003). The death of animals was scored for up to 7 days after inoculation and survivors were then euthanized. For infectivity transmission assays, crude homogenates were prepared from dead or euthanized animals previously inoculated with RNA (Baranowski *et al.*, 2003) and used at a 1:100 dilution to inoculate suckling mice. Total RNA was phenol/chloroform extracted from mice homogenates for RT-PCR amplification and subsequent sequencing of the VP2–VP1 region, as above.

For *in vivo* neutralization assays, mice were injected intraperitoneally with a mixture containing 50 µl virus at different dilutions and 50 µl tenfold dilution of supernatant of hybridoma culture of mAb SD6 (Mateu *et al.*, 1987). Neutralizing mAb SD6 was raised against C-S8c1 FMDV and recognizes a non-conserved epitope (aa 138–156) in the immunogenic region of VP1 including the RGD motif (Mateu *et al.*, 1987, 1990). After inoculation, dead mice were scored as above. When mAb SD6 was used under the same conditions for *in vitro* neutralization assays on IBRS-2 cells, after incubation at 37 °C for 48 h, 100% neutralization of infectivity was observed for C-S8c1 virus at an m.o.i. of 1 (the highest tested), whilst no neutralizing effect could be detected for O1K virus, even at the lowest m.o.i. assayed yielding CPE (m.o.i. of 0.01).

## RESULTS AND DISCUSSION

### High tolerance to substitutions in the FMDV RGD region may generate viruses with expanded tropism on cell culture, independent of the capsid sequence context

The amino acid substitutions shown in Fig. 1 were introduced into full-length cDNA clones containing the VP1 protein from FMDV C-S8c1 or 213hs<sup>-</sup>, respectively. C-S8c1 derives from a pig isolate (Sobrino *et al.*, 1983) and uses integrins as receptors (Baranowski *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2000b). Its derivative, 213, was modified to abolish the ability to infect cells using HS, acquired after multiple passage on BHK-21 cells (Baranowski *et al.*, 1998), by introducing mutation K173M into the VP3 protein to produce 213hs<sup>-</sup>. Mutant RNAs derived from full-length clones (Fig. 1) were transfected into BHK-21 cells, in all cases generating infectious virus. On average, a complete CPE was observed at around 24 h post-transfection (p.t.) for 213hs<sup>-</sup> and 4 days for C-S8c1 mutants. When fresh BHK-21 monolayers were inoculated with aliquots of transfection medium, CPE was detected within 3 days post-infection (p.i.).

Sequencing of capsids from the viruses recovered (Table 1) showed that, in the C-S8c1 sequence context, the D143A and L144P mutations were not viable, as only the corresponding revertants were recovered from transfections. In contrast, H146A replacement was fully tolerated and complete CPE was observed at around 24–48 h p.t. with no additional changes in the capsid. Previous data

**Table 1.** Capsid sequences of viruses recovered from transfection of mutant RNAs derived from C-S8c1 and 213hs<sup>-</sup> clones and subsequent passage in cell culture

Amino acid residues at the mutated position and additional substitutions found in the capsid proteins are indicated. The transfected mutant sequence is underlined. Substitutions found that are not in VP1 are indicated with the corresponding capsid protein and position. Sequence mixtures at single positions are indicated with a solidus. Amino acids corresponding to the C-S8c1 or 213hs<sup>-</sup> parental sequence are indicated in bold. When viral populations recovered from independent experiments showed differences in capsid sequence, these are indicated as (i) and (ii), respectively.

RNA	Transfection	Passage in cell culture*		
		BHK-21	CHO	
			Wild-type	pgsA-745
C-S8c1	C-S8c1 wt	+	—	—
C-S8c1/R141A	<u>A141</u> , S/R139, T/M148, H/R†154, VP2 I/F†132	<u>A141</u> , S139R, T148M	—	ND
C-S8c1/G142A	T142	T142	—	ND
C-S8c1/D143A	D143	+	—	ND
C-S8c1/L144A	(i) <u>A/V144</u> (ii) <u>A/V†144</u> , T/K148‡	(i) M†/V144 (ii) V144, T/K148	(i) — (ii) <u>A144</u> , A145V, VP2 K198E‡	(i) ND (ii) <u>A144</u> , A145V, VP2 K198E
C-S8c1/L144P	L144	+	—	ND
C-S8c1/H146A	<u>A146</u>	+	—	ND
C-S8c1/L147A	(i) <u>A147</u> (ii) <u>A147</u> , T/A†148	(i) <u>A147</u> , VP3 D9V (ii) <u>A147</u> , T/A†148	(i) ND (ii) —	(i) ND (ii) ND
213hs <sup>-</sup>	213hs <sup>-</sup> wt‡	+	D/G†59	D/G†59
213hs <sup>-</sup> /R141A	<u>A141</u>	+	<u>A141</u> , D/G†59, VP3 M/K†173	<u>A141</u> , D/G†59
213hs <sup>-</sup> /G142A	<u>A142</u>	+	<u>A142</u> , D/G†59	<u>A142</u> , D/G†59
213hs <sup>-</sup> /D143A	<u>A143</u> ‡	+	<u>A143</u>	<u>A143</u>
213hs <sup>-</sup> /L144A	<u>A144</u>	+	<u>A144</u> , D/G59, Q/R†/K200	<u>A144</u> , D/G59, Q/R†/K200
213hs <sup>-</sup> /L144P	<u>P144</u>	+	<u>P144</u> , VP3 M/K†173	<u>P144</u> , VP3 M/K†173
213hs <sup>-</sup> /H146A	<u>A146</u>	+	<u>A146</u> , VP3 M/K†173	<u>A146</u> , VP3 M/K†173
213hs <sup>-</sup> /L147A	<u>A147</u>	+	<u>A147</u> , D/G†59, Q/R†200	<u>A147</u> , D/G†59, Q/R200
213hs <sup>-</sup> /L147P	<u>P147</u>	+	<u>P147</u> , D59G	<u>P147</u> , D59G

\*Results of at least two independent infections. ND, Not done; +, infection yielding cytolitic viruses whose capsid sequences were not determined; —, no CPE after infection and three blind passages.

†Residue in a proportion of approximately ≥ 50 %.

‡Viruses with hs<sup>-</sup> phenotype confirmed by a heparin–Sepharose binding assay (ratio ~1) as described in Methods.

have shown the relative insensitivity of this position to peptide inhibition of infectivity (Mateu *et al.*, 1996). Interestingly, a Thr substitution at position 142 was observed in viruses obtained after transfection with G142A RNA as well as following infection, whilst reversion to G was not detected. Conversion from Ala (GCG) to Thr (ACG) involves transition G→A, whilst reversion to Gly (GGG) would need the transversion C→G. Mateu *et al.* (1996) demonstrated the high inhibitory effect of peptides carrying T142 on viral infectivity, suggesting their binding to cell integrins. Mutants R141A and L147A maintained the corresponding substitutions, but additional changes were acquired in the G–H loop and other capsid proteins after transfection or passage on BHK-21 cells. For mutant R141A, CPE was complete at 6 days p.t. Sequence mixtures were detected at three VP1 positions within the G–H loop and one in the VP2 E–F loop (Acharya *et al.*, 1989); R139

has been found in viruses resistant to SD6 neutralizing mAb (Martínez *et al.*, 1997). After passage in BHK cells, only the S139R and T148M substitutions were detected in the capsid. For L147A, in the initial experiment the substitution was fully tolerated with no other changes until passage on BHK-21 cells, and cytopathic manifestations were observed at 2 days p.t. In a second experiment, CPE was delayed (4 days p.t.) and the sequence mixture found at position 148 was maintained after infection of BHK-21 cells; A148 has been reported for a 50-passage virus carrying a GGG motif (Ruiz-Jarabo *et al.*, 1999). Replacement L147P was not included in this study, as Núñez *et al.* (2001) previously found it to be deleterious in the C-S8c1 capsid. Substitution L144A was initially tolerated as a mixture with Val and, in one case, with an additional change at position 148. This last virus population induced complete CPE at 6 days p.t. After

infection, Met and/or Val was found at this position. V144 has been reported in a virus resistant to SD6 mAb (Martínez *et al.*, 1997), and Met is a residue normally found at this position in other FMDV serotypes (Burman *et al.*, 2006). Reversion from Ala (GCG) to Leu (TTG) would require 2 nt substitutions (a transversion and a transition, respectively). However, the replacements Ala (GCG) to Val (GTG) and Val (GTG) to Met (ATG) would only need a single change (transition). As a mixture of Ala/Val was firstly detected in transfection supernatants and then after passage Val/Met mixture was selected, it seems likely that sequence changes occurred in that order. L144 has been predicted to be a relevant residue for integrin binding in previous studies using RGD peptides (Burman *et al.*, 2006; Dicara *et al.*, 2008; Mateu *et al.*, 1996). Our results showed the relevance of L144 for integrin binding in the context of the virus. The viability of C-S8c1 virus with changes in the RGD region has not been reported previously in cell culture, as only substitutions affecting integrin recognition domains have been found after multiple passage in cells (Baranowski *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1997).

When the capsid sequence of viruses recovered from 213hs<sup>-</sup> mutants was determined, significant differences were found relative to their C-S8c1 counterparts. Indeed, the corresponding Ala or Pro mutations were recovered in all cases from BHK-21 cells with no other substitutions in the capsid (Table 1). Interestingly, 213hs<sup>-</sup> capsid tolerated the mutations D143A (recovered at 48 h p.t.), L144P and L147P, all of which were deleterious in the C-S8c1 capsid. Residues at the RGD +1 and +4 sites have been shown to be major contributors to integrin-binding specificity (Burman *et al.*, 2006).

In order to explore further the mechanism of viral entry used by the mutants to infect cultured cells, supernatants from BHK-21 monolayers transfected with the different mutants were inoculated onto CHO cells. FMDV isolates adapted to grow in cell culture can infect wt CHO cells using HS as a receptor, whilst C-S8c1 virus is unable to infect this cell line due to restriction of its entry through integrins. Mutant glycosaminoglycan-deficient pgsA-745 CHO cells were inoculated in the same way to address whether any of the mutants had acquired the alternative uncharacterized entry route described for C-S8c1 virus after 100 passages carrying an RGG mutation and hs<sup>-</sup> (Baranowski *et al.*, 1998, 2000). O1K virus derived from the pO1K full-length clone (able to use HS as a receptor) at an m.o.i. of 0.1 induced complete CPE in wt CHO at 24–48 h p.i., whilst no CPE could be detected in mt CHO cells (data not shown). Interestingly, CPE was detected in wt and mt CHO cells at 48–72 h p.i. with viruses carrying the VP1 sequence A/V144 and T/K148 recovered from BHK-21 cells transfected with C-S8c1/L144A. Sequencing of the viruses generated in CHO cells revealed the presence of a substitution from Ala to Val at position 145 of the G–H loop, as reported in a virus resistant to SD6 mAb (Martínez *et al.*, 1997), and an additional change at VP2 position 198 from Lys to Glu (Table 1). With the aim of ruling out the

use of HS as a receptor by these viruses, their hs<sup>-</sup> phenotype was confirmed by heparin-binding assays (Table 1). These results showed that C-S8c1 can modify its receptor usage and expand its tropism to CHO cells with as few as three changes in the capsid protein. It is worth noticing that viral populations carrying the A/V144 sequence but lacking the T/K148 mixture were unable to infect CHO cells, as were the remaining viruses recovered from BHK-21 transfections (Table 1). Lys at position 198 of the VP2 protein is involved in non-covalent interactions between pentamer subunits in the C-S8c1 capsid (Mateo *et al.*, 2003). Substitution of Lys for the negatively charged Glu may be inducing structural changes in the capsid affecting receptor interaction.

In contrast, all 213hs<sup>-</sup> mutants generated from transfections induced CPE in wt and mt CHO cells at 24–48 h p.i. Although maintaining the corresponding mutations in the RGD region, sequence mixtures or substitutions were detected at positions 59 and 200 of VP1 and position 173 of VP3 throughout the mutants capsids (Table 1). Position 59 is part of the B–C loop at the amino terminus of VP1 (Acharya *et al.*, 1989), in which mutations perturbing the stability of the G–H loop have been reported (Parry *et al.*, 1990). Q200R substitution, in antigenic site C (Mateu & Verdaguier, 2004), was selected in viruses carrying a FLAG peptide sequence after passage in BHK-21 (Baranowski *et al.*, 2001). D/G59 and Q/R200 mixtures were also found in IBRS-2 cells transfected with some of the 213hs<sup>-</sup> mutants (data not shown), suggesting that these substitutions are not linked specifically to replication in CHO cells. In some of the viruses recovered from wt and mt CHO cells, partial reversions to Lys at position 173 in the VP3 protein were detected (Table 1). As pgsA-745 CHO cells are HS deficient, no relevant contribution to viral entry through HS can be expected for this sequence mixture in these viruses.

Viruses recovered from transfection of 213hs<sup>-</sup>/D143A RNA infected wt and mt CHO cells with no other changes in the capsid. This mutation was lethal in the C-S8c1 context, presumably abolishing interaction with integrins. The hs<sup>-</sup> phenotype of 213hs<sup>-</sup>/A143 viruses was confirmed by a heparin–Sepharose binding assay (Table 1). This result demonstrated that these viruses can infect CHO cells using an RGD- and HS-independent route. Binding to heparin in viruses recovered from transfections with 213hs<sup>-</sup>/wt RNA was also not detected (Table 1). Interestingly, unlike 213hs<sup>-</sup> viruses, a mAb-resistant viral population generated after passage 213 (MARLS) lost infectivity in wt and mt CHO cells after selection by 10 rounds of heparin–Sepharose binding (MARLS<sup>hs-</sup>) (Baranowski *et al.*, 1998). The contribution of other sequences in the viral genome or present in the capsid at amounts below detection levels for this difference between 213hs<sup>-</sup> and MARLS<sup>hs-</sup> viruses cannot be ruled out.

Our results showed that FMDV parental genomes can accommodate substitutions in the RGD region, whilst additional changes in flanking residues are, in some cases,

**Table 2.** Infectivity of RNA transcripts in suckling mice and virulence of resultant viruses

Amount of RNA inoculated	No. dead animals/no. inoculated	
	RNA infectivity*	Virulence†
C-S8c1/R141A		
50 µg	0/2	
10 µg	1/11 (4)	5/6
5 µg	0/6 (1)	
1 µg	0/10	
500 ng	0/4	
200 ng	0/2	
100 ng	0/2	
C-S8c1/G142A		
20 µg	5/5	3/3
10 µg	4/5	
5 µg	1/1	
1 µg	0/5	
500 ng	0/4	
200 ng	0/2	
100 ng	0/2	
C-S8c1/D143A		
100 µg	0/2 (1)	0/3
50 µg	0/2	0/3
10 µg	0/1	
1 µg	0/5	
500 ng	0/4	
200 ng	0/2	
100 ng	0/2	
C-S8c1/L144A		
50 µg	2/2	
10 µg	4/5	3/3
5 µg	4/4	
1 µg	3/10 (1)	
500 ng	0/9 (2)	
200 ng	0/5	
100 ng	0/4	

selected. However, aa 143 remained resistant to changes, probably due to structural constraints essential for integrin binding in the wt capsid sequence. In contrast, viral genomes highly adapted to cell culture were able to incorporate these mutations with no other changes in the capsid, maintaining their capacity to enter cells using the non-RGD, non-HS route. In fact, this still uncharacterized route would be the only possible way known so far to enter BHK-21 cells for D143A, L144P and L147P mutants. Replacements selected in C-S8c1 and 213hs<sup>-</sup> mutant capsids in cultured cells were different, showing substantial flexibility to changes that are accommodated differently depending on the capsid context. The concept of tolerance to a given mutation is therefore relative and depends on the capsid sequence.

#### Virulence on suckling mice is only abolished by replacements in position D143 of the RGD region

To address the effect of substitutions in the RGD region on FMDV infectivity and transmission in suckling mice, the

**Table 2.** cont.

Amount of RNA inoculated	No. dead animals/no. inoculated	
	RNA infectivity*	Virulence†
C-S8c1/L144P		
50 µg	1/2 (1)	
10 µg	2/5	1/3
5 µg	1/5 (1)	
1 µg	4/6 (1)	
500 ng	1/5	
200 ng	0/2	
100 ng	0/2	
C-S8c1/H146A		
10 µg	1/4 (2)	1/3
5 µg	2/5	
1 µg	0/5	
C-S8c1/L147A		
10 µg	2/2	3/3
5 µg	3/3	
1 µg	2/5	

\*No. of dead/no. of inoculated animals after inoculation with the corresponding RNAs. Transcripts derived from parental full-length clone 213hs<sup>-</sup> and the 213hs<sup>-</sup>/D143A mutant up to 20 µg failed to kill any mice. The number of animals showing early signs of disease (transient tremors and ataxia) and subsequent healing is shown in parentheses.

†No. of dead/no. of inoculated animals after inoculation with homogenates from single animals from the corresponding RNA-inoculated mice. In groups including survivors after RNA inoculation, homogenates were prepared from a dead mouse (Baranowski *et al.*, 2003). For the C-S8c1/D143A mutant, two mice were euthanized, including one that showed early signs of disease.

different mutant RNAs were assayed by intraperitoneal injection, as described previously (Baranowski *et al.*, 2003) (Table 2). In the C-S8c1 context, all of the RNAs except mutant D143A were infectious, although with different levels of lethality. Transcripts derived from the parental full-length clone pO1K/C-S8c1 (Fig. 1), used to construct all of the C-S8c1 mutants assayed here, were fully infectious at RNA amounts of approximately 1 µg (Baranowski *et al.*, 2003). D143A transcripts up to 100 µg failed to kill any mice. Several inoculations with homogenates from either an animal that showed early signs of disease after RNA injection or an asymptomatic mouse also failed to kill. Thus, the presence of D143 seems to be a strict requirement for C-S8c1 infectivity in mice, as observed in BHK-21 cells (Table 1). This is in agreement with the high level of conservation of residue D143 among natural FMDV isolates (Carrillo *et al.*, 2005) and supports its relevance in binding to integrin receptors. Very low levels of infectivity were exhibited by R141A RNA. Only one animal died after inoculation with 10 µg of transcript, but homogenates from this mouse were lethal in a new round of inoculation, indicating the presence of infectious virus. This suggests that R141 can occasionally become dispensable and is consistent



with previous data *in vivo* showing that viruses carrying SGD or GGD could be isolated from cattle infected with FMDV type A and C isolates, respectively (Rieder *et al.*, 2005; Taboga *et al.*, 1997; Tami *et al.*, 2003). H146A RNA killed mice with 5 µg of transcript, and homogenates from dead mice killed only one of the three animals inoculated. This result contrasted with the absolute tolerance to the H146A mutation in cultured cells (Table 1), suggesting that this replacement affects fitness differently in mice compared with cell culture. The substitutions G142A, L144A and L147A were well tolerated with RNA amounts ≤ 5 µg able to kill approximately 50 % of the inoculated animals. L144P RNA was lethal from 0.5 µg but none of the doses assayed could kill 100 % of the inoculated mice. We previously described the infectivity of L147P transcripts in mice (Baranowski *et al.*, 2003). As mentioned above, and again consistent with the lethality patterns obtained in mice, L144P and L147P have both been found in viable viruses replicating in target species (Taboga *et al.*, 1997; Tami *et al.*, 2003).

The capsid sequence of viruses generated after RNA inoculation was determined as above from the mice homogenates used for virulence assays. In all cases, the capsid sequence was maintained. Only for the L144P mutant was an additional replacement of L201I detected in the VP1 carboxyl terminus within antigenic site C (Mateu & Verdaguer, 2004). Substitution R141A was confirmed, with no additional changes, in viruses infecting one of the five mice that died in the virulence assay. For D143A, viral RNA could not be amplified by RT-PCR, confirming that no infectious virus was generated.

When transcripts derived from parental full-length clone 213hs<sup>-</sup> and the 213hs<sup>-</sup>/D143A mutant were assayed, amounts up to 20 µg were innocuous for mice (data not shown). The high level of attenuation found for these genotypes in mice is in agreement with previous reports showing the attenuated phenotype *in vivo* conferred by mutations selected during serial passage in cultured cells (Neff *et al.*, 1998; Sa-Carvalho *et al.*, 1997). Indeed, we have shown previously the lack of infectivity in suckling mice of FMDV O1K transcripts bearing an H56R substitution in the VP3 protein, selected in type O isolates upon passage in cell culture (Baranowski *et al.*, 2003). Interestingly, supernatant from BHK-21 cells transfected with 213hs<sup>-</sup> transcripts inoculated into mice resulted in 100 % lethality at a tenfold dilution (data not shown). The viruses recovered from dead mice had amino acid mixtures of VP1 R197 with Ser and VP3 K218 with Arg and Gln throughout the capsid, suggesting the relevance of these positions to regaining infectivity *in vivo*. However, several trials to infect mice with supernatants from 213hs<sup>-</sup>/D143A-transfected cells failed to kill any mice (not shown).

Although additional effects on the viral cycle of the replacements analysed here cannot be ruled out, our results show that substitutions in the RGD region are differentially tolerated in cultured cells and animals,

suggesting different sequence requirements for viral entry *in vitro* and *in vivo*. These constraints can be modulated efficiently in cultured cells by the surrounding capsid sequence, and, in some cases, the viral population rapidly selects additional changes in the capsid (see C-S8c1 mutants R141A, L144A and L147A). However, mutant viruses with non-canonical RGDs were infectious for mice with no or few changes in their capsids (Table 2 and L144P mutant, respectively). Some of these viruses showed patterns of lethality not directly dependent on the inoculation dose, probably due to suboptimal binding affecting integrin affinity and/or specificity.

The integrin receptor  $\alpha_v\beta_6$  is expressed constitutively on epithelial cells targeted by FMDV in cattle and sheep (Brown *et al.*, 2006; Monaghan *et al.*, 2005). Similarly,  $\alpha_v\beta_6$  in mouse epithelia is highly expressed in the lung, skin and kidney during organogenesis, although barely detectable in adult animals, but is rapidly and transiently induced in response to local injury or inflammation (Huang *et al.*, 1996). Activation *in vivo* of different integrin species during infection has been suggested as a mechanism to switch on receptors for viral entry (Luo *et al.*, 2007). Although there is no direct experimental evidence on receptors used by FMDV in mice, and no extrapolation regarding virulence or pathology can be made to natural viral hosts at present, our results for the susceptibility of suckling mice to FMDV RNAs were in all cases consistent with information available on their viability in target species (see the L144P and L147P mutants). In fact, infectivity in primary bovine thyroid cell cultures of guinea pig-adapted FMDV, carrying the L147P mutation, can be specifically inhibited with anti- $\alpha_v\beta_6$  mAb, strongly suggesting that this virus, infectious for pigs and suckling mice, is using this integrin as a receptor in the animal host (Núñez *et al.*, 2007). With the aim of testing the involvement of the RGD region in FMDV virulence in mice, we tried *in vivo* neutralization assays with virus preparations co-inoculated with mAb SD6 (Table 3). Neutralizing mAb SD6 recognizes the immunogenic region of VP1 spanning aa 138–156 in the G–H loop enclosing the RGD (Mateu *et al.*, 1987, 1990). The effect of blockage of infectivity was dramatic for

**Table 3.** Infectivity of C-S8c1 in mice is abolished by incubation with specific neutralizing mAb SD6 binding to the RGD region

No. of dead/no. of inoculated animals at 4 days p.i. with dilutions of O1K or C-S8c1 virus ( $5.4 \times 10^7$  and  $2.7 \times 10^6$  p.f.u. ml<sup>-1</sup>, respectively) in the presence or absence of SD6 mAb.

SD6	O1K		C-S8c1			
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
–	2/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
+	3/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5

C-S8c1 virus against which the mAb had been elicited. However, the virulence of O1K virus was not affected by the presence of the mAb, which is unable to bind heterologous type O isolates. As monovalent steric inhibition of receptor binding is the major mechanism by which antibody SD6 neutralizes FMDV infectivity (Verdaguer *et al.*, 1997), these results indicate that viral entry in mice is determined by capsid sequences overlapping the binding area of SD6, mainly the RGD region, supporting the use of integrins for FMDV infection in suckling mice. In agreement with this, the patterns of lethality observed in mice for the different transcripts were, in all cases, consistent with previous data *in vivo* regarding the corresponding altered positions. Therefore, we believe that the RNA virulence assay in suckling mice can be widely used for screening of FMDV genotypes that are viable *in vivo*. However, further characterization of the integrins expressed in mice will help to correlate receptor usage in mice compared with the natural host species.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank E. Domingo, M. A. Martín and B. Borrego for helpful discussions and critical reading of the manuscript. This work was supported by grants QLK2-CT2002-01719 and RTA03-201 to M. S., BIO2005-07592-C02-01 to F. S., CSD2006-0007, Fundación Severo Ochoa, 'Ramón y Cajal' (M.S.) and 'Juan de la Cierva' (M.G.-R.) programs, and a fellowship from INIA (M.R.P.).

## REFERENCES

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. & Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**, 709–716.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Beck, E. & Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**, 6362–6372.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E. & Domingo, E. (2000). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* **74**, 1641–1647.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Lim, F. & Domingo, E. (2001). Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain. *Virology* **288**, 192–202.
- Baranowski, E., Molina, N., Núñez, J. I., Sobrino, F. & Sáiz, M. (2003). Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with *in vitro*-transcribed RNA. *J Virol* **77**, 11290–11295.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P. W. & Baxt, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin  $\alpha_v\beta_3$ ) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* **69**, 2664–2666.
- Brown, J. K., McAleese, S. M., Thornton, E. M., Pate, J. A., Schock, A., Macrae, A. I., Scott, P. R., Miller, H. R. & Collie, D. D. (2006). Integrin- $\alpha_v\beta_6$ , a putative receptor for foot-and-mouth disease virus, is constitutively expressed in ruminant airways. *J Histochem Cytochem* **54**, 807–816.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N. G., Fry, E. E., Stuart, D. I. & Jackson, T. (2006). Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for  $\alpha_v$  integrins. *J Virol* **80**, 9798–9810.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**, 6487–6504.
- Dicara, D., Burman, A., Clark, S., Berryman, S., Howard, M. J., Hart, I. R., Marshall, J. F. & Jackson, T. (2008). Foot-and-mouth disease virus forms a highly stable, EDTA-resistant complex with its principal receptor, integrin  $\alpha_v\beta_6$ : implications for infectiousness. *J Virol* **82**, 1537–1546.
- Domingo, E., Mateu, M. G., Martínez, M. A., Dopazo, J., Moya, A. & Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In *Applied Virology Research, Virus Variation & Epidemiology*, vol II, pp. 233–266. Edited by E. Kurstak, R. G. Marusyk, S. A. Murphy & M. H. V. van Regenmortel. New York: Plenum Publishing.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Carrillo, E., Núñez, J. I. & Sobrino, F. (2003). Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**, 47–63.
- Duque, H. & Baxt, B. (2003). Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine  $\alpha_v$  integrin utilization by type A and O viruses. *J Virol* **77**, 2500–2511.
- Duque, H., LaRocco, M., Golde, W. T. & Baxt, B. (2004). Interactions of foot-and-mouth disease virus with soluble bovine  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_6$  integrins. *J Virol* **78**, 9773–9781.
- Escarmis, C., Dávila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A. & Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**, 255–267.
- Fernández, F. M., Borca, M. V., Sadir, A. M., Fondevila, N., Mayo, J. & Schudel, A. A. (1986). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet Microbiol* **12**, 15–24.
- Fry, E. E., Stuart, D. I. & Rowlands, D. J. (2005). The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**, 71–101.
- Huang, X. Z., Wu, J. F., Cass, D., Erle, D. J., Corry, D., Young, S. G., Farese, R. V., Jr & Sheppard, D. (1996). Inactivation of the integrin  $\beta_6$  subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *J Cell Biol* **133**, 921–928.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W. & King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **70**, 5282–5287.
- Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R. A., Blakemore, W. E., Ellard, F. M., Simmons, D. L., Newman, J. W., Stuart, D. I. & King, A. M. (1997). Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin  $\alpha_v\beta_3$  *in vitro*. *J Virol* **71**, 8357–8361.
- Jackson, T., Blakemore, W., Newman, J. W., Knowles, N. J., Mould, A. P., Humphries, M. J. & King, A. M. (2000a). Foot-and-mouth disease virus is a ligand for the high-affinity binding conformation of integrin  $\alpha_5\beta_1$ : influence of the leucine residue within the RGD motif on selectivity of integrin binding. *J Gen Virol* **81**, 1383–1391.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W. & King, A. M. (2000b). The epithelial integrin  $\alpha_v\beta_6$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**, 4949–4956.
- Jackson, T., Mould, A. P., Sheppard, D. & King, A. M. (2002). Integrin  $\alpha_v\beta_1$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**, 935–941.
- Jackson, T., King, A. M., Stuart, D. I. & Fry, E. (2003). Structure and receptor binding. *Virus Res* **91**, 33–46.

- Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S. & King, A. M. (2004). Integrin  $\alpha_v\beta_8$  functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the  $\beta$ -chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol* **78**, 4533–4540.
- Leippert, M., Beck, E., Weiland, F. & Pfaff, E. (1997). Point mutations within the  $\beta$ G- $\beta$ H loop of foot-and-mouth disease virus O1K affect virus attachment to target cells. *J Virol* **71**, 1046–1051.
- Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J. & other authors (1993). Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* **362**, 566–568.
- Luo, B. H., Carman, C. V. & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**, 619–647.
- Martínez, M. A., Verdaguer, N., Mateu, M. G. & Domingo, E. (1997). Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6798–6802.
- Mason, P. W., Rieder, E. & Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1932–1936.
- Mason, P. W., Grubman, M. J. & Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* **91**, 9–32.
- Mateu, R., Díaz, A., Baranowski, E. & Mateu, M. G. (2003). Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in a foot-and-mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function. *J Biol Chem* **278**, 41019–41027.
- Mateu, M. G. & Verdaguer, N. (2004). Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies. In *Foot-and-Mouth Disease, Current Perspectives*, pp. 223–260. Edited by F. Sobrino & E. Domingo. Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Mateu, M. G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedroso, E., Giralt, E., Enjuanes, L. & Domingo, E. (1987). Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **8**, 261–274.
- Mateu, M. G., Martínez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. & Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71**, 629–637.
- Mateu, M. G., Valero, M. L., Andreu, D. & Domingo, E. (1996). Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem* **271**, 12814–12819.
- McKenna, T. S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B. & Mason, P. W. (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* **69**, 5787–5790.
- Monaghan, P., Gold, S., Simpson, J., Zhang, Z., Weinreb, P. H., Violette, S. M., Alexandersen, S. & Jackson, T. (2005). The  $\alpha_v\beta_6$  integrin receptor for *Foot-and-mouth disease virus* is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol* **86**, 2769–2780.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P. W., Blystone, S. D., Brown, E. J. & Baxt, B. (1998). Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin  $\alpha_v\beta_3$  as its receptor. *J Virol* **72**, 3587–3594.
- Neff, S., Mason, P. W. & Baxt, B. (2000). High-efficiency utilization of the bovine integrin  $\alpha_v\beta_3$  as a receptor for foot-and-mouth disease virus is dependent on the bovine  $\beta_3$  subunit. *J Virol* **74**, 7298–7306.
- Núñez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sánchez, C., Domingo, E. & Sobrino, F. (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**, 3977–3983.
- Núñez, J. I., Molina, N., Baranowski, E., Domingo, E., Clark, S., Burman, A., Berryman, S., Jackson, T. & Sobrino, F. (2007). Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *J Virol* **81**, 8497–8506.
- Parry, N., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., Fry, E., Acharya, R., Logan, D. & Stuart, D. (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* **347**, 569–572.
- Pereira, H. G. (1981). Foot-and-mouth disease virus. In *Virus Diseases of Food Animals*, vol.2, pp. 333–363. Edited by E. P. G. Gibbs. New York: Academic Press.
- Rieder, E., Berinstein, A., Baxt, B., Kang, A. & Mason, P. W. (1996). Propagation of an attenuated virus by design: engineering a novel receptor for a noninfectious foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10428–10433.
- Rieder, E., Henry, T., Duque, H. & Baxt, B. (2005). Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site *in vitro* and its pathogenesis in cattle. *J Virol* **79**, 12989–12998.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Dávila, M., Gómez-Mariano, G., Baranowski, E. & Domingo, E. (1999). Antigenic properties and population stability of a foot-and-mouth disease virus with an altered Arg-Gly-Asp receptor-recognition motif. *J Gen Virol* **80**, 1899–1909.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Baranowski, E., Dávila, M., Gómez-Mariano, G. & Domingo, E. (2004). Expansion of host-cell tropism of foot-and-mouth disease virus despite replication in a constant environment. *J Gen Virol* **85**, 2289–2297.
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A. & Mason, P. W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* **71**, 5115–5123.
- Sáiz, M., Gómez, S., Martínez-Salas, E. & Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**, 93–101.
- Sáiz, M., Núñez, J. I., Jimenez-Clavero, M. A., Baranowski, E. & Sobrino, F. (2002). Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect* **4**, 1183–1192.
- Skinner, H. H. (1951). Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc R Soc Med* **44**, 1041–1044.
- Sobrino, F., Dávila, M., Ortín, J. & Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**, 310–318.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Núñez, J. I., Rodríguez, A., Sáiz, J. C., Blanco, E., Valero, M. L., Roig, X. & other authors (1997). A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol* **71**, 2606–2614.
- Tami, C., Taboga, O., Berinstein, A., Núñez, J. I., Palma, E. L., Domingo, E., Sobrino, F. & Carrillo, E. (2003). Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus *in vivo*. *J Virol* **77**, 1219–1226.
- Verdaguer, N., Fita, I., Domingo, E. & Mateu, M. G. (1997). Efficient neutralization of foot-and-mouth disease virus by monovalent antibody binding. *J Virol* **71**, 9813–9816.
- Zhao, Q., Pacheco, J. M. & Mason, P. W. (2003). Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in animals. *J Virol* **77**, 3269–3280.

## Attenuated Foot-and-Mouth Disease Virus RNA Carrying a Deletion in the 3′ Noncoding Region Can Elicit Immunity in Swine<sup>▽</sup>

Miguel Rodríguez Pulido,<sup>1,2</sup> Francisco Sobrino,<sup>1,2</sup> Belén Borrego,<sup>2</sup> and Margarita Sáiz<sup>1,2\*</sup>

*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain,<sup>1</sup> and Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain<sup>2</sup>*

Received 1 September 2008/Accepted 1 February 2009

We constructed foot-and-mouth disease virus (FMDV) mutants bearing independent deletions of the two stem-loop structures predicted in the 3′ noncoding region of viral RNA, SL1 and SL2, respectively. Deletion of SL2 was lethal for viral infectivity in cultured cells, while deletion of SL1 resulted in viruses with slower growth kinetics and downregulated replication associated with impaired negative-strand RNA synthesis. With the aim of exploring the potential of an RNA-based vaccine against foot-and-mouth disease using attenuated viral genomes, full-length chimeric O1K/C-S8 RNAs were first inoculated into pigs. Our results show that FMDV viral transcripts could generate infectious virus and induce disease in swine. In contrast, RNAs carrying the  $\Delta$ SL1 mutation on an FMDV O1K genome were innocuous for pigs but elicited a specific immune response including both humoral and cellular responses. A single inoculation with 500  $\mu$ g of RNA was able to induce a neutralizing antibody response. This response could be further boosted by a second RNA injection. The presence of the  $\Delta$ SL1 mutation was confirmed in viruses isolated from serum samples of RNA-inoculated pigs or after transfection and five passages in cell culture. These findings suggest that deletion of SL1 might contribute to FMDV attenuation in swine and support the potential of RNA technology for the design of new FMDV vaccines.

*Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) is a member of the *Picornaviridae* family and the causative agent of an acute vesicular disease considered a major animal health problem worldwide, affecting pigs, ruminants, and other cloven-hoofed livestock (32, 53). The virus consists of a nonenveloped particle enclosing a single-stranded positive-sense RNA molecule of about 8.5 kb in length, with the viral protein VPg covalently linked to the 5′ end and a poly(A) tract at the 3′ end. The viral genome contains a single open reading frame flanked by two highly structured noncoding regions (NCRs) at their 5′ and 3′ termini, respectively (7). The 5′ NCR, approximately 1,300 nucleotides in length, includes sequences required for the initiation of replication and translation, comprising the S fragment, a 360-nucleotide-long region predicted to form a large hairpin structure (23, 62), a poly(C) tract, multiple pseudoknots, the *cis* replication element (*cre*) (38), and the internal ribosome entry site (IRES) (37). The 3′ NCR is a sequence of about 100 nucleotides predicted to be structured in two stem-loops, SL1 and SL2 (55). We have previously shown the strict requirement of the 3′ NCR for FMDV infectivity and replication (52) and the stimulatory effect of this region on IRES-dependent translation, even in the absence of a poly(A) tail (36). Moreover, the 3′ NCR interacts with the IRES and S regions located at the 5′ end through direct RNA-RNA interactions (55). Cellular proteins binding to the 3′ NCR have also been described (36, 48). Some of these factors are also able to interact with the S region and undergo pro-

teolytic cleavage upon FMDV infection (48). The putative role of these interactions in circularization of the FMDV genome has been suggested (55).

Information available from picornaviruses of the genus enterovirus shows that complete deletion of the 3′ NCR (oriR) may yield viable viruses without any compensating mutations in their genomes, while partial distortions of the individual structural domains forming the oriR (45) generally result in the loss of virus viability (11, 58, 59). An intramolecular “kissing” interaction between the X and Y domains was found to be crucial for an efficient functioning of the oriR in virus replication (42, 46). Interestingly, a coxsackievirus B3 mutant with a deletion of the enterovirus B-like-specific Z domain, fully infectious in cell culture, resulted in reduced virulence for mice, suggesting that the Z domain plays a role in virus replication *in vivo* (43). Consistent with that, domain Z has been implicated in cellular tropism involving *cis*-acting interactions with the IRES (19).

With the aim of further characterizing the functional structures comprising the FMDV 3′ NCR, independent deletions of the two predicted stem-loops were performed on a full-length (FL) infectious FMDV clone. Our results show that SL2 is essential to preserve viability of the virus, while SL1 could be deleted without a loss of infectivity. Interestingly, the  $\Delta$ SL1 mutation yielded viruses with a diminished replication capacity and small-plaque phenotype in IBRS-2 cells.

The involvement of the 3′ NCR in controlling the processes of replication and translation of the viral RNA highlights its relevance in the infectious cycle and makes this region a suitable candidate for antiviral and vaccination strategies. RNA vaccines seem particularly appropriate for picornaviruses, since their positive-sense single-stranded RNA genomes are infectious and can be mutated to reduce viral production.

\* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-91-1964522. Fax: 34-91-1964420. E-mail: msaiz@cbm.uam.es.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on 11 February 2009.

**Antibody detection.** Specific antibodies in sera against whole virus were detected by a trapping ELISA against unpurified C-S8c1 captured by a rabbit anti-serotype C serum (provided by the IAH, Pirbright, United Kingdom) using anti-swine immunoglobulin (Ig)-horseradish peroxidase (Dako). Antibodies against the nonstructural protein precursor 3ABC were also detected by ELISA as described previously (9), adapted to swine sera, which were tested in threefold dilutions beginning from a 1:50 dilution. For each animal, serum collected at day



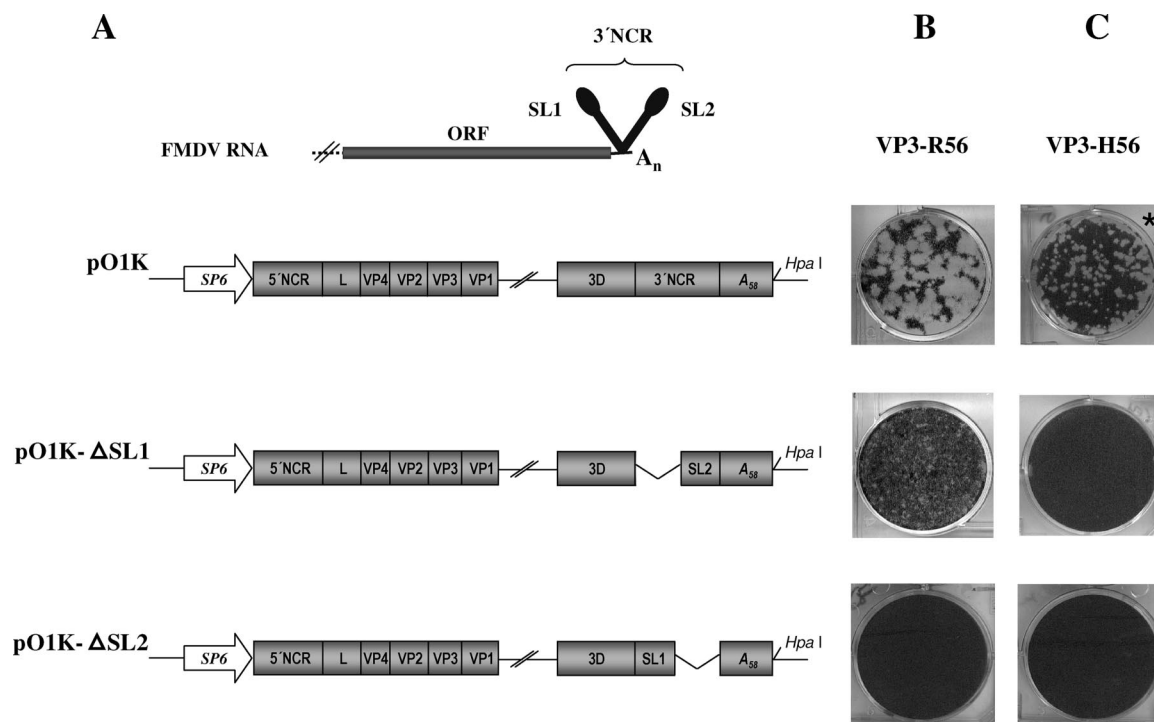


FIG. 1. Effect of deletions of the 3' NCR stem-loop structures on FMDV replication in cell culture. (A) Schematic representation of the viral genomes used in this study. (B and C) RNA transcripts of the FMDV O1K cDNAs were transfected into IBRS-2 cells, and the number and morphology of plaques formed by the resulting viruses were determined by plaque assay. Plaques corresponding to VP3-R<sub>56</sub> clones at 40 h p.t. (B) or VP3-H<sub>56</sub> clones at 48 h p.t. (C) are shown. \*, cells at 48 h postinfection with the transfection supernatant.

0 was included as the corresponding negative control. Titers in the ELISA were expressed as the log<sub>10</sub> of the highest serum dilution with an optical density at 450 nm (OD<sub>450</sub>) greater than at least twice the OD of the negative control serum mean. For IgA isotype-specific detection, a monoclonal antibody specific for porcine IgA from Serotec was used, followed by incubation with goat antimouse-horseradish peroxidase from Bio-Rad. Sera were tested at 1:50, 1:100, and 1:200 dilutions. IgA titers were expressed as the OD<sub>450</sub> ratio of the corresponding serum versus that of the preimmune serum (day 0). Neutralizing antibodies were determined by a plaque reduction neutralization assay (39). Sera were tested in fivefold dilutions, with 1:20 being the first dilution assayed. Neutralization titers were expressed as the reciprocal of the serum dilution (log<sub>10</sub>) that caused 50% of plaque reduction.

**Lymphocyte proliferation assay.** Blood aliquots collected with 5 mM EDTA were used to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after Ficoll-Paque purification (Pharmacia). The total number of live PBMC recovered was estimated by trypan blue staining. Purified cells were used to test the specific proliferative responses to FMDV as described previously (27, 28). Briefly,  $2.5 \times 10^5$  live PBMC/well were plated in 96-well round-bottomed microtiter plates in RPMI-10% FBS. Triplicate wells of cells were stimulated with two different doses of FMDV ( $1.5 \times 10^5$  or  $6.2 \times 10^5$  PFU) for 3 days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. As controls, triplicates of cells were incubated in the absence of virus (negative control) or with concanavalin A (2.5 µg/well) (positive control). Three days after stimulation, each well was pulsed for 18 h with 0.5 µCi of [*3*H]thymidine (Amersham), and the radioactivity incorporated in harvested cells was measured. Results were expressed as the stimulation index (cpm in sample/cpm in medium alone). To obtain further information regarding the pathway of antigen presentation inducing the lymphoproliferative responses, stimulation was performed in the presence of saturating concentrations of monoclonal antibody 4B7 (13) or 1F12 (12) (kindly provided by J. Domínguez), which block porcine major histocompatibility complex (MHC) (SLA) class I or class II presentation, respectively.

**Statistical analysis.** Data are presented as means  $\pm$  standard deviations. A one-way analysis of variance and Bonferroni's correction for multiple comparisons were used to determine statistical significance ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS

**Deletion of stem-loop I from the FMDV 3' NCR reduced viral growth and replication in cell culture.** We demonstrated in previous work the essentiality of the 3' NCR for FMDV RNA infectivity and proved its involvement in replication and translation, as well as interaction with cellular proteins, presumably playing a role in regulation of both processes (36, 48, 52, 55). RNAs bearing a deletion of the complete 3' NCR were unable to infect cells due to their impaired replicative capacity (52). As a continuation of these studies, independent deletions of the two structural domains predicted in the 3' NCR (55) were performed on the FMDV pO1K FL clone (Fig. 1A). The infectivities of the corresponding mutants as determined by plaque assay on IBRS-2 cells is shown in Fig. 1B. Deletion of SL2 was lethal for viral infectivity, since no viable virus was recovered from transfections and two blind passages. However, deletion of SL1 did not abrogate viral infectivity, although a delay in CPE development and different plaque morphology could be observed (Fig. 1B). IBRS-2 monolayers transfected with ΔSL1 RNA led to a detectable CPE 40 h p.t., about 24 h later than transfection with transcripts of the FL viral construct. Viruses generated from ΔSL1 RNA produced small pinpoint plaques compared to O1K-FL RNA. The small-plaque phenotype was maintained after at least five passages in IBRS-2 and BHK-21 cells (not shown). The infectivity of ΔSL1 transcripts on IBRS-2 cells was about  $10^3$  PFU/µg RNA, approximately 10-fold lower than that of FL viral transcripts (52).

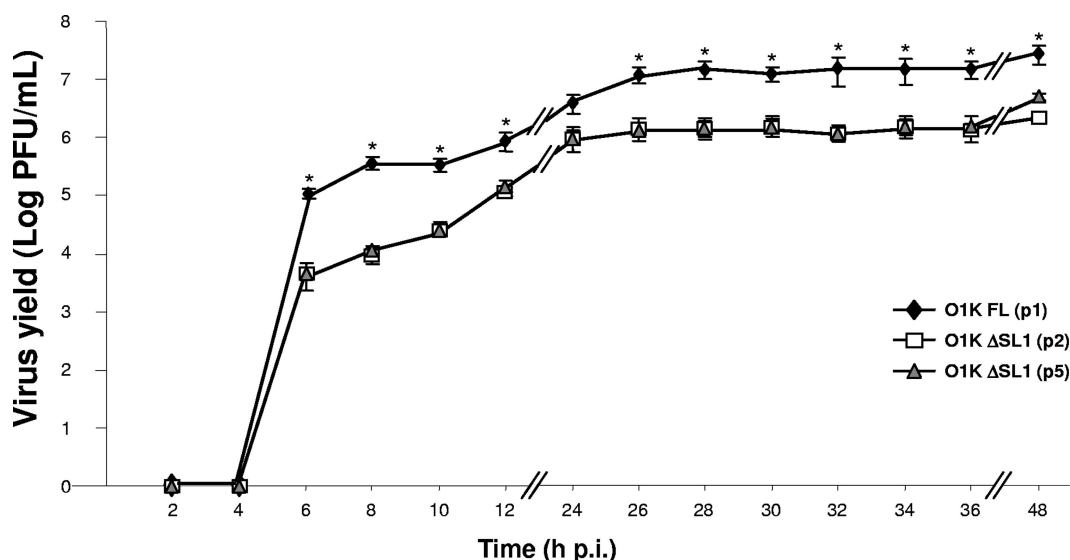


FIG. 2. Growth curves of FMDV O1K (VP3-R<sub>56</sub>) FL virus and the  $\Delta$ SL1 mutant in IBRS-2 cells. Cells were infected at a MOI of 0.1 with viral stocks recovered after transfection and one passage of FL virus or after a second or fifth passage of  $\Delta$ SL1 on IBRS-2, respectively. Numbers of PFU were determined at the indicated time points by plaque assay. The mean values of three experiments are shown. Error bars indicate standard deviations. Asterisks denote time points with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between  $\Delta$ SL1 viruses (p2 and p5) and FL virus (p1).

To examine their replication capacities, the growth kinetics of the  $\Delta$ SL1 mutant was compared to that of parental FL virus (Fig. 2). Cells were infected at a MOI of 0.1 using O1K-FL or - $\Delta$ SL1 viral stocks subjected to titer determination by plaque assay. The comparative growth of the viruses indicated about 10-fold-lower levels of replication for the mutant than for the FL virus. Growth kinetics of the  $\Delta$ SL1 mutant after two and five passages of the transfection supernatant on IBRS-2 cells were similar, showing that the mutant was unable to reach the growth levels of parental virus even after five passages on cell culture.

In order to further characterize the kinetics of replication of the  $\Delta$ SL1 mutant bearing a deletion in *cis*-acting structural domains, presumably involved in RNA synthesis, intracellular viral positive- and negative-strand RNAs were quantified in transfected BHK-21 cells by means of real-time RT-qPCR (Fig. 3). A decrease of  $\sim 1.2$  log in positive-strand RNA levels was observed at 16 h p.t. in cells transfected with the  $\Delta$ SL1 mutant relative to levels of FL viral RNA. When negative-strand RNA levels were compared, relevant differences in negative-strand RNA synthesis were found between FL RNA and the  $\Delta$ SL1 mutant (about 20-fold) at 4 h p.t., when no CPE was yet observed in transfected cells. This difference increased over time, reaching values up to 300-fold at 16 h p.t., when cells transfected with FL RNA were entering the cytopathology phase but were still attached to the plates, while cells transfected with the  $\Delta$ SL1 mutant had not developed any sign of CPE. The ratio of positive- versus negative-strand viral RNA in transfected cells was  $\sim 10$ -fold higher for the  $\Delta$ SL1 mutant than for FL RNA at both 4 and 16 h p.t. These results show that deletion of SL1 yielded mutant viruses with a defect in negative-strand RNA synthesis.

To address whether the  $\Delta$ SL1 mutant genotype was genetically stable over passage on cell culture, we determined the 3'-terminal sequences of the viruses recovered from duplicate

transfections and their corresponding first and fifth passages on BHK-21 and IBRS-2 cells, respectively. In all cases, the presence of the  $\Delta$ SL1 mutation with no additional changes was confirmed. The complete genome sequences of viruses recovered after transfection and first and fifth passages on BHK-21 cells were determined. All viruses recovered after first and fifth passages on BHK-21 cells included the amino acid replacements Lys-90  $\rightarrow$  Thr and Thr-63  $\rightarrow$  Lys in the 2C and 3C nonstructural proteins, respectively (not shown). Thr-63 in the 3C protein, unlike the case for position 90 in the 2C protein, is a widely conserved residue among FMDV isolates (14), though an Asia1-type Indian isolate with an Ala-63 residue has been reported (Asia1 IND/182/02; GenBank accession no. DQ989320). None of these positions, as far as we know, have been reported as relevant for functionality in their corresponding viral non-structural proteins. Viruses carrying those changes exhibited the same growth and plaque phenotype as the  $\Delta$ SL1 virus, maintaining the O1K wild-type sequence. No substitutions relative to the wild-type O1K sequence could be found in the region spanning the 2A through 3C genes of  $\Delta$ SL1 viruses recovered from parallel experiments performed with the porcine IBRS-2 cell line.

Taken together, all these results indicate that deletion of SL1 from the FMDV 3' NCR yielded viable viruses with reduced growth in cell culture and impaired viral replication. Unlike SL2, SL1 was not essential for replication, likely functioning as an enhancer of the process. This strongly suggests that deletion of SL1 might lead to viral attenuation.

**Inoculation of pigs with in vitro-transcribed FMDV RNA generated infectious virus and induced clinical signs of disease.** To explore the feasibility of RNA-based genetic immunization using FMDV transcripts, we first tested the generation of infectious virus in swine upon inoculation with different amounts of O1K/C-S8 RNA (Table 1), derived from a chimeric cDNA carrying the type-C structural proteins within the O1K

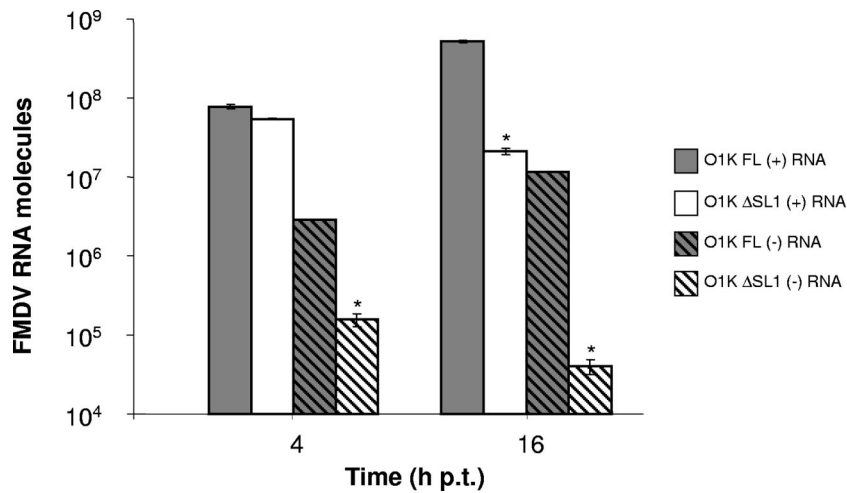


FIG. 3. Quantification of intracellular positive- or negative-strand FMDV RNA molecules by real-time RT-qPCR in BHK-21 cells transfected with O1K (VP3-R<sub>56</sub>) FL or ΔSL1 transcript, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation (error bar) of RNA copy numbers per ng of cytoplasmic RNA extracted from transfected cells from quadruplicate determinations. Asterisks indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between results for ΔSL1 and FL positive- or negative-strand RNAs at each time point.

backbone (5). O1K/C-S8 transcripts had proved to be lethal for suckling mice, unlike transcripts derived from pO1K (4). As shown in Table 1, all three animals inoculated with O1K/C-S8 viral transcripts, regardless of the RNA dose, displayed typical clinical signs of FMD within 2 to 4 days after inoculation. The number and size of lesions were undistinguishable from those developed by animals experimentally infected with live virus. Interestingly, an uninoculated contact animal housed in the same room developed FMD 7 days p.i., indicating that the virus generated upon RNA inoculation was able to be excreted and transmitted to healthy animals following standard patterns of disease, as in field and experimental infections (2, 20).

The presence of viral RNA in different samples collected at several times p.i. was confirmed by RT-PCR detection (Table 1), and fully infectious virus could be isolated in cell culture from vesicular fluid of a foot lesion from pig 3. In this sample, viral antigen was detected by ELISA (data not shown). Moreover, sera collected from all four swine showed significant neutralization titers, and high levels of antibodies to the structural and nonstructural 3ABC proteins were also detected (Table 1). These results demonstrate the feasibility of using RNA inoculation to elicit specific antibodies against FMDV in swine.

**Replication in cells and mice of O1K-FL, -ΔSL1, and -ΔSL2 viruses carrying VP3-H<sub>56</sub>.** After the encouraging results obtained from pigs inoculated with O1K/C-S8 transcripts, we aimed to study the immunogenic capacity of the ΔSL1 mutant in pigs as self-replicating RNA yielding potentially attenuated viruses.

The amino acid substitution H56R in the FMDV VP3 capsid protein, present in the pO1K clone and derivatives, is known to greatly account for viral attenuation in bovines and is associated with adaptation to cell culture and increased affinity for heparin (31, 49). Consistently, O1K-FL transcripts derived from the parental pO1K clone were previously found to be uninfected for mice (4). With the aim to give ΔSL1 transcripts a chance to express the viral proteins at the necessary level to induce a detectable immune response upon inoculation

in susceptible animals, wild-type His was restored in position 56 of all constructs. Transcripts generated from the new constructs were first tested for infectivity in cell culture. As shown in Fig. 1C, infectious viruses could be recovered from transfections with RNA derived from pO1K-FL(VP3-H<sub>56</sub>), though complete development of a CPE was observed only after one passage on IBRS-2 cells. After a second passage in cell culture, only Arg was found in position VP3-56 and no His could be detected. In contrast, VP3-H56 in the ΔSL1 mutant induced a complete loss of infectivity, since no CPE could be observed after three blind passages. As expected, the O1K-ΔSL2(VP3-H<sub>56</sub>) mutant was not able to infect cells (Fig. 1C). The viru-

TABLE 1. Pigs inoculated with FMDV O1K/C-S8 transcripts developed disease and generated specific antibodies

Animal	RNA dose (μg)	Day p.i. of:		Neutralizing antibody titer (day p.i.) <sup>g</sup>	ELISA antibody titer (day p.i.) <sup>h</sup>	
		Development of clinical signs of disease <sup>a</sup>	Positive RT-PCR detection <sup>b</sup>		Anti-type C	Anti-3ABC
1	150	3	3 <sup>c</sup>	>3.4 (22)	2.6 (22)	3.6 (22)
2	300	2	3 <sup>d</sup> , 4 <sup>c,e</sup>	1.7 (4)	ND <sup>i</sup>	ND
3	500	4	4 <sup>f*</sup>	1.6 (4)	ND	2.2 (4)
Contact	0	7	8 <sup>c,d,e</sup>	2.6 (8)	ND	ND

<sup>a</sup> Day p.i. when first clinical signs of disease were manifested (vesicular lesions and fever). Euthanasia was performed at day 22 p.i. (pig 1), 4 p.i. (pig 2), or 8 p.i. (pig 3 and contact).

<sup>b</sup> Numbers indicate the day p.i. when sample was collected. The asterisk indicates the sample from which infectious virus was isolated.

<sup>c</sup> Vesicular epithelium.

<sup>d</sup> Serum.

<sup>e</sup> Lymph nodes.

<sup>f</sup> Vesicular fluid.

<sup>g</sup> Titers are expressed as the reciprocal of the highest serum dilution (log<sub>10</sub>) that caused 50% of plaque reduction. Serum samples were taken at the day p.i. indicated in parenthesis.

<sup>h</sup> Titers are expressed as the reciprocal of the of the highest serum dilution (log<sub>10</sub>) with an OD<sub>450</sub> greater than twice the negative control mean. Serum samples were taken at the day p.i. indicated in parenthesis.

<sup>i</sup> ND, not determined.



TABLE 2. Detection of viral RNA by RT-PCR in serum samples from pigs inoculated with 500 µg of FMDV O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA<sup>a</sup>

Animal	Detection of RNA at day (p.i.):													
	0	3	4	5	6	10	12	17	24 <sup>b</sup>	28	31	35	41	45
1	—	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	—
2	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—
5	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> Viral RNA could not be detected in nasal swabs collected from all eight animals on days where results are highlighted in bold.

<sup>b</sup> Animals 1 to 4 were boosted with 500 µg of O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA at day 24 after the first inoculation. Serum samples were taken prior to the boost, and thereafter sera were collected only from boosted animals.

<sup>c</sup> Pig 4 died at day 35 p.i. during bleeding.

lence of all transcripts carrying VP3-H<sub>56</sub> was then tested in suckling mice as described previously (4), and none of the mutants was lethal after inoculation of RNA amounts up to 100 µg, as was also the case for their VP3-R<sub>56</sub> counterparts (not shown). This result indicates that the VP3 R56H substitution itself was not sufficient to revert the attenuated phenotype of the O1K RNA in mice.

**O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA is attenuated in swine.** The lack of amplification of O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) virus in cell culture and the noninfectious phenotype observed in suckling mice strongly suggested that deletion of SL1 was affecting FMDV virulence. Then, we wanted to determine whether this FMDV mutant genome was attenuated in the natural host and study the clinical and immune responses to inoculation with the corresponding mutant RNA transcripts in swine. For that purpose, experimental inoculation of two groups of animals was carried out (Table 2). All of them were given 500 µg of O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) transcripts. Group 1, including animals 1 to 4, received a second dose of RNA at day 24 p.i. Clinical parameters such as rectal temperature, appetite, and fecal consistency remained normal, and none of the animals developed vesicular lesions throughout the experiment (up to 45 days after first inoculation). Once it was proved to be innocuous for pigs, we tried to detect viral mutant RNA in serum and nasal swabs, collected at different times p.i., as an evidence of viral replication. Positive RT-PCR amplification was detected in serum at day 12 p.i. for all animals and earlier for three of them (see Table 2). After a second injection, viral RNA could be detected in two pigs of group 1 (days 11 and 17 after boosting for pigs 4 and 1, respectively) (Table 2). On day 45 p.i., viral RNA was not detected in serum from any of the eight inoculated animals. The amplification products were in all cases detected as a faint band in a highly sensitive assay. These results demonstrated the high attenuation level of O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA in swine, since none of the inoculated animals showed any sign of disease after one or two doses of 500 µg of transcripts. The onset of viremia exhibited by the virus generated was consistent with a low level of replication extended over time, in contrast with results for experimental infection with virus (2) or with FMDV O1K/C-S8 RNA (Table 1, pig 2), both showing a peak around days 2 and 4 p.i. as an average. Our failure to detect virus in nasal swabs from inoculated animals, even at time points when serum samples were

RT-PCR positive (Table 2, pigs 1 and 8), indicated the limited replication of the mutant, which was unable to reach this area, critical for virus excretion. The viral load in serum from pig 1 at day 10 p.i. was determined by RT-qPCR to be  $1 \times 10^7$  viral genomes per ml of serum. This is about  $10^2$ -fold lower than viremia levels reported for pigs inoculated with fully infectious type O FMDV (2). Although O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA was not able to grow on cell culture, we wanted to rule out the putative emergence of cytolytic variants. Our attempts to isolate virus in IBRS-2 cells from positive serum samples and the corresponding swabs from the same animal and time point failed even after three blind passages. The regions spanning the 3' NCR, VP3, and 2C through 3C genes were amplified for sequence analysis from serum samples of pigs 1 and 2 collected at day 10 p.i. and pig 8 at day 4 p.i. (data not shown). The presence of the SL1 deletion was confirmed, and no other changes or insertions were detected. In the three samples, His56 in the VP3 protein was confirmed as well. When the sequence of the region spanning the 2C through 3C genes was determined, as in porcine IBRS-2 cells, no substitution could be detected in the three samples relative to O1K wild-type sequence, unlike what was found in BHK-21 cells. These data support the *in vivo* stability of the O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) mutant.

**Immune responses induced after inoculation with O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>).** To determine whether inoculation with FMDV O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) transcripts, despite the high levels of attenuation exhibited in pigs, was able to induce an immune response in the RNA-injected animals, neutralization and lymphocyte proliferation assays were performed. As shown in Fig. 4, a single immunization was sufficient to induce detectable levels of neutralizing antibodies in all four animals in group 2 (pigs 5 to 8), reaching the highest levels around day 12 p.i. Group 1 (pigs 1 to 4) showed higher interindividual variation. After a single RNA immunization, two out of four animals developed neutralizing antibodies, while a second RNA dose induced 100% seroconversion and increased significantly the neutralizing titers for pig 4. In the case of pigs 4 and 8, the levels of neutralizing response were equivalent to those induced with inactivated whole-virus vaccine (16, 41, 57). For pigs 4, 6, and 8, neutralizing antibodies were maintained for at least 35 to 45 days (Fig. 4). Systemic IgA responses were also examined for pigs 4 and 8 (Fig. 4). Induction of specific IgA in sera and

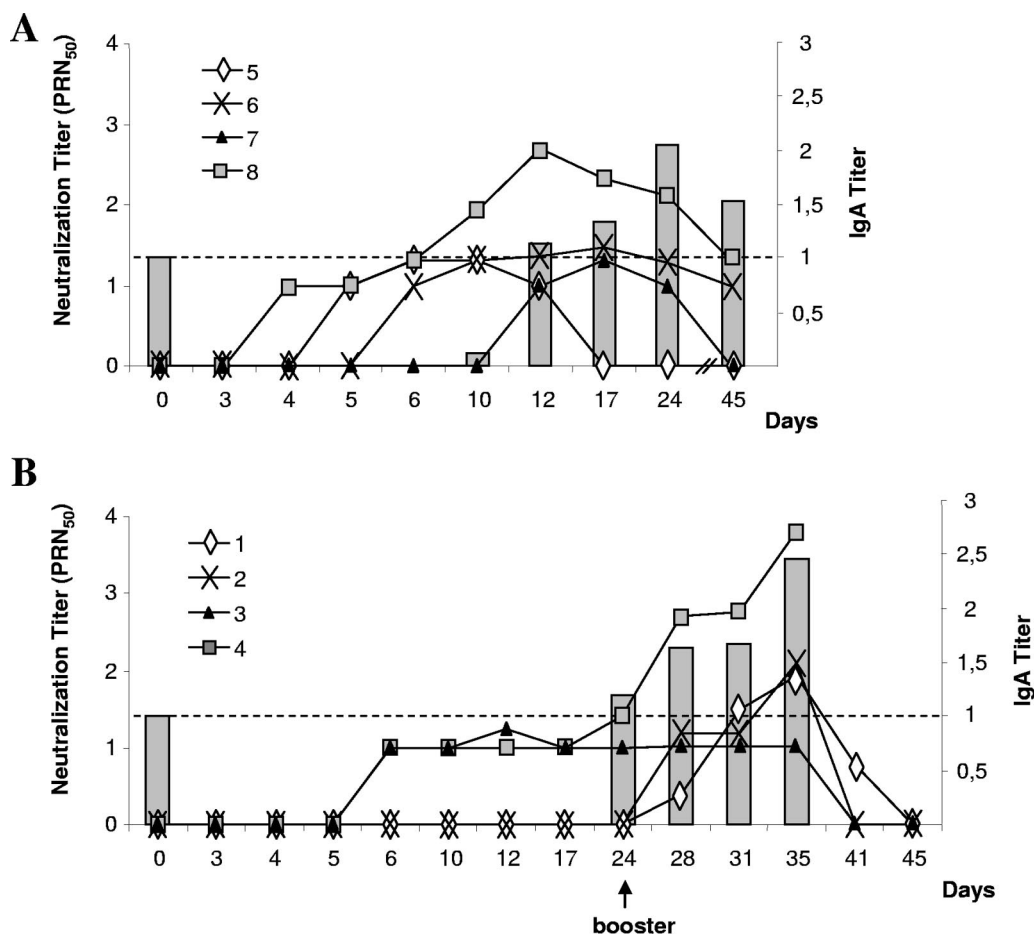


FIG. 4. Neutralizing antibody and IgA-specific responses induced in pigs upon inoculation with O1K- $\Delta$ SL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA. Pigs 5 to 8 (group 2) received a single RNA dose (A), and pigs 1 to 4 (group 1) were boosted with a second RNA inoculation 24 days after the first dose (B). Neutralization titers are expressed as the reciprocal of serum dilution ( $\log_{10}$ ) causing 50% of plaque reduction (PRN<sub>50</sub>). IgA responses in sera from pigs 8 and 4 at the indicated days are plotted in panels A and B, respectively. IgA titers are expressed as the OD<sub>450</sub> ratio of the corresponding serum at dilution 1:50 versus that of the serum collected at day zero.

upper mucosae has been correlated with protection in infected and vaccinated pigs (18, 22, 26). ELISA titers of  $>2$  (corresponding to a 1:50 dilution of serum) were detected for both animals. In the case of pig 8, the IgA response was first detected at day 24 p.i. and decreased at day 45 p.i. For pig 4, induction of IgA was detected at day 35 p.i., 11 days after boosting. The IgA titers reached were similar to that of the ELISA-positive control serum used, collected after 15 days postinfection from a pig inoculated with type O virus (not shown). We also addressed the ability of the mutant transcripts to elicit a cellular immune response. Figure 5 shows the results of lymphocyte proliferation assays corresponding to those animals for which a specific stimulatory effect was detected 45 days after the first inoculation (and 21 days after boosting). Two of these animals had received a single RNA dose, and the other two had been given a booster dose at day 24 p.i. Interestingly, pig 8, showing the highest stimulation index, had received a single RNA dose. The high stimulation index obtained with concanavalin A in all cases (reaching values over 21) showed the unaffected capacity of lymphocytes to proliferate after 45 days of inoculation with viral RNA. Although we failed

to detect significant stimulation in PBMC from the remaining animals, alternating periods of high and low T-cell responses have been previously reported for pigs and cattle (50). The significance of the results obtained was confirmed using specific antibodies directed against SLA classes I and II, respectively. Both antibodies had an inhibitory effect on stimulation of 56 to 83% (Fig. 5), revealing the involvement of both class I and class II pathways of antigen presentation in the lymphoproliferative responses detected. These results indicated that inoculation of O1K- $\Delta$ SL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA is able to elicit specific humoral and cellular immune responses.

## DISCUSSION

In previous work, we have shown the relevance of the 3' NCR in the FMDV RNA genome for the productive infectious cycle (52). Structural domains in this region have been identified to establish RNA-RNA interactions with *cis*-acting elements present in the 5' end of the genome, involved in replication and translation. With the aim of further characterizing the functional structures forming the 3' NCR, independent

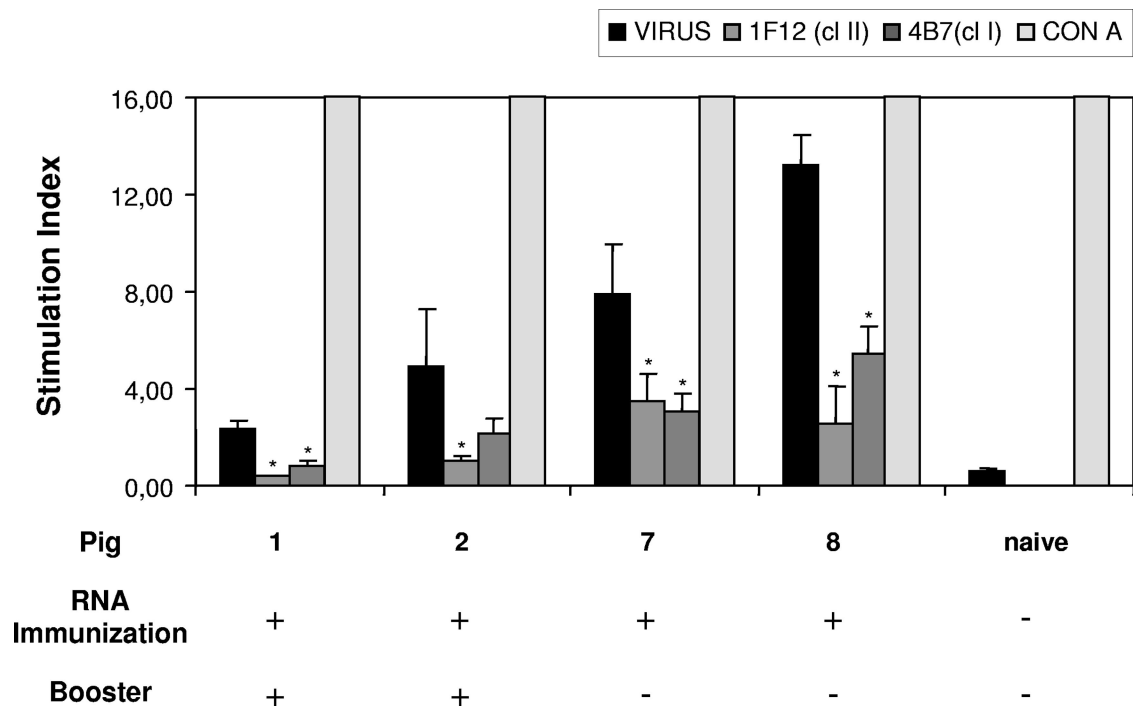


FIG. 5. Proliferative T-cell optimal responses to FMDV detected in pigs inoculated with O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA at day 45 p.i. (day 21 after boosting for pigs 1 and 2). The results of triplicate assays are shown as stimulation indexes using  $1.5 \times 10^5$  PFU (pigs 1, 7, and 8) or  $6.2 \times 10^5$  PFU (pig 2). Where indicated, cells were incubated in the presence of anti-swine MHC (SLA) class I (cl I) or class II (cl II) monoclonal antibody 4B7 or 1F12, respectively, or with concanavalin A (CON A). The cpm in control cultures were 6,893 (pig 1), 1,507 (pig 2), 300 (pig 7), and 1,180 (pig 8). Error bars indicate standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) with the corresponding untreated cells.

deletions of the two predicted stem-loops were performed on the FL infectious FMDV clone. Infectivity assays of the mutants in cell culture showed that SL2 was essential to preserve virus viability while deletion of SL1 allowed recovery of infectious viruses without a complete loss of infectivity. ΔSL1 viruses had a small-plaque phenotype and a reduced growth capacity, with titers consistently 10-fold lower than those of FL virus after serial passages on IBRS-2 cells. Quantification of the positive- or negative-strand viral RNA in cells transfected with either FL or ΔSL1 transcripts, respectively, showed that deletion of SL1 generated viruses with downregulated replication associated to a defect in negative-strand RNA synthesis, leading to differences of up to 300-fold in negative-strand RNA relative to results for FL RNA at late times p.t. Consistently, the ratio of positive- to negative-strand RNAs was 10-fold higher for the ΔSL1 mutant at the two times p.t. analyzed. It is worth noticing that an RNA probe resembling the 3' terminus of the ΔSL1 virus, enclosing SL2 and poly(A), was shown to reproduce the interaction pattern of the entire 3' NCR with the 5'-end S region (55). While SL2 seems to be strictly required for RNA synthesis, SL1 could be acting as a replication enhancer. It remains to be determined whether the ability of SL2 to mimic the interaction of the entire 3' NCR with the S region could account for the preserved but diminished replication capacity of the ΔSL1 mutant. Although infectious clones bearing complete 3' NCR deletions, enclosing both SL1 and SL2, were able to translate in vitro (52), the stimulatory effect exerted by the 3'-terminal sequences on IRES-dependent

translation (36) might therefore be broken down in ΔSL1 viruses.

Previous work on enteroviruses shows that the 3' NCR is dispensable for viral viability while the poly(A) tail, which is partly included in the stem-loop structure of domain X, is an element required for efficient replication and translation (64). This suggests that the basic mechanism for initiation of enterovirus replication is not strictly template specific (58). In the case of FMDV, some structural requirements seem to be necessary for negative-strand RNA synthesis, suggesting differences in the mechanism of recognition by the replication machinery.

The replication-defective phenotype exhibited by ΔSL1 virus in cell culture led us to explore the infectivity and potential use as an RNA-based vaccine in natural host animals of FMDV transcripts derived from infectious clones. For that purpose, the feasibility of immunization of swine with FMDV transcripts was first analyzed. Inoculation of pigs with O1K/C-S8 RNA, previously shown to be lethal for suckling mice (4), induced FMD symptoms and typical development of disease. The viruses generated upon inoculation were able to be excreted and infect a contact animal. Fully infectious virus could be detected and isolated in samples from inoculated and contact pigs, all developing high titers of specific anti-FMDV and neutralizing antibodies. These results demonstrate the capacity of FMDV RNA transcripts to induce disease in pigs, reproducing the typical patterns of FMD reported for viral infections. The RNA inoculation model of natural host species may

be useful for virulence assays of viral genotypes and strongly supports the feasibility of genetically engineered RNA-based vaccine strategies for FMD control in large host animals.

With the aim of trying delivery of transcripts carrying the  $\Delta$ SL1 mutation into pigs, residue 56 in the VP3 capsid protein was previously restored from Arg to wild-type His in the FMDV O1K infectious clone. The presence of Arg56 together with other positively charged amino acids in surrounding positions, all selected after passage on cell culture, has been associated with a high level of attenuation of type O isolates in bovines (49). The O1K- $\Delta$ SL1 mutant bearing a His at position 56 of VP3 lost the growth capacity of its VP3-R<sub>56</sub> small-plaque-phenotype parental virus in cell culture. As was the case for their VP3-R<sub>56</sub> counterparts, O1K-FL and - $\Delta$ SL2 transcripts with VP3-H<sub>56</sub> were innocuous for suckling mice.

Inoculation of one or two doses of 500  $\mu$ g of O1K- $\Delta$ SL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA failed to induce any clinical sign of disease in pigs, and no infectious virus could be isolated in cell culture from serum samples. However, viral RNA could be faintly amplified from sera collected from each animal at late times p.i., indicating low levels of replication extended over time. FMDV RNA can be readily detected in nasal swabs both before and after development of clinical disease and even in subclinically infected animals (2). In contrast, viral RNA could not be amplified from nasal swabs taken from RNA-inoculated pigs, suggesting that replication-defective O1K- $\Delta$ SL1(VP3-H<sub>56</sub>) virus was unable to reach these epithelia. This is a relevant issue, since airborne excretion of virus from infected animals is an important route of disease transmission.

Neutralizing antibodies appear to be the major protective component in swine and ruminants against FMDV (40). However, protection in the absence of detectable neutralizing antibodies has been documented (17, 56). Neutralization tests revealed that even a single inoculation with nonpathogenic O1K- $\Delta$ SL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA induced significant levels of neutralizing antibodies whose titers were increased (with the exception of pig 3) by a second RNA booster dose. Interestingly, one of the animals with the highest neutralization titers had received a single RNA inoculation (pig 8). Induction of specific IgA responses was detected in serum from the animals showing a higher neutralizing response (pigs 4 and 8). Several studies associate the induction of specific IgA with protection and suggest that vaccines that induce local IgA responses may be more effective (18, 22, 26). Moreover, mutant transcripts were able to induce a specific T-cell response in four out of the eight animals inoculated. The viral stimulatory effect was specifically inhibited with monoclonal antibodies against swine MHC (SLA) class I or class II, respectively. Taken together, our results show that inoculation with O1K- $\Delta$ SL1(VP3-H<sub>56</sub>) transcripts is able to elicit a broad immune response involving humoral and both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cellular responses.

To address whether the contribution of input RNA translation, independent of replication, was relevant for the immune response induced in RNA-inoculated animals, control experiments with mice were carried out. Neutralizing antibodies against FMDV were detected in serum at day 15 p.i. in 44% ( $n = 16$ ) of adult Swiss mice inoculated in the tibialis anterior muscle with 10 to 50  $\mu$ g of O1K/C-S8 RNA, viremic at 48 h p.i., while no specific response to the virus could be detected in mice inoculated with 100  $\mu$ g of nonreplicating O1K- $\Delta$ 3'NCR

(VP3-H<sub>56</sub>) transcripts ( $n = 6$ ) (data not shown). This suggests that viral replication is required to some extent for effective immunization.

The finding that the O1K- $\Delta$ SL1(VP3-H<sub>56</sub>) mutant is attenuated for swine while preserving immunogenicity has relevant implications for vaccine development. Although the use of attenuated viruses involves the concern for the risk of reversion to pathogenic viruses, deletion mutations are more stable than point mutations and reversion of the attenuated phenotype is unlikely. Moreover, even though infectivity of O1K-FL(VP3-H<sub>56</sub>) parental RNA has not been assayed in swine and so the specific contribution of the SL1 deletion to attenuation of this RNA cannot be directly assessed without further studies, the effect observed on replication in cell culture, including that with a porcine cell line, might be operating in swine as well. The lack of infectivity observed for the O1K-FL(VP3-H<sub>56</sub>) transcripts in mice suggest a certain level of attenuation for the O1K backbone itself. Indeed, the association of several attenuation factors in the same construct may contribute to the safety of a putative candidate vaccine. Additionally, we have shown that the  $\Delta$ SL1 mutation was maintained after at least five serial passages in BHK-21 and IBRS-2 cells and at day 10 p.i. in pigs.  $\Delta$ SL1 viruses grown in porcine IBRS-2 cells or viral genomes amplified from pig serum samples showed wild-type sequence in 2C and 3C nonstructural proteins, unlike some  $\Delta$ SL1 viruses passaged on BHK-21 cells, which carried substitutions in those proteins.

RNA-based vaccines emerge as good potential vaccine candidates for positive-stranded RNA viruses for which infectious cDNA clones are available. In vitro-synthesized RNA can be delivered into host animals as an attenuated live vaccine, mimicking natural infection without actually inducing disease. RNA replicative forms including double-stranded RNA also stimulate various components of the innate and specific immune response (34). An RNA vaccine against coxsackievirus B3 bearing point mutations at the cleavage site between the 2A and 2B proteins conferred substantial protection against virus challenge (30). Highly efficient self-replicating noninfectious RNA vaccine candidates against flavivirus have been generated (1, 33, 47). A recombinant dengue virus type 4 containing a 30-nucleotide deletion in the 3' NCR was immunogenic in humans and has been proposed as a live attenuated vaccine candidate (10, 21). Infectious transcripts from a FL infectious clone of bovine viral diarrhea virus delivered by use of a gene gun have been shown to induce humoral immunity in cattle and sheep against the virus (60).

Current FMD vaccines consist of purified inactivated virus preparations. These vaccines have proven useful in preventing the disease but present important constraints, such as the risk of virus escape from production plants and the difficulty in distinguishing infected animals from uninfected vaccinates. New vaccine strategies aimed at overcoming these problems have been developed, including subunit vaccines consisting of VP1 protein or chemically synthesized peptides (57, 61), different DNA constructs expressing viral immunogens (6, 8, 15), and recombinant viruses (25, 35, 44, 54, 63). Live attenuated candidate vaccines for FMD lacking the leader L protease and mutations in the receptor binding sequence RGD have also been proposed (3, 16). To our knowledge, this is the first report of FMDV RNA-based immunization. The protective efficacy



of O1K-ΔSL1(VP3-H<sub>56</sub>) RNA in swine will be the aim of future work, which will contribute to further evaluating the feasibility of RNA-based FMD vaccines.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants QLK2-CT2002-01719 and RTA03-201 to M.S., BIO2005-07592-C02-01 to F.S., CSD2006-0007, Ramón y Cajal program (to M.S.), and a fellowship from INIA (to M.R.P.).

We thank M. Navarro and M. González for excellent technical assistance and E. Martínez-Salas and M. Gutiérrez for critical reading of the manuscript.

#### REFERENCES

- Aberle, J. H., S. W. Aberle, R. M. Kofler, and C. W. Mandl. 2005. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* **79**:15107–15113.
- Alexandersen, S., M. Quan, C. Murphy, J. Knight, and Z. Zhang. 2003. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Pathol.* **129**:268–282.
- Almeida, M. R., E. Rieder, J. Chinsangaram, G. Ward, C. Beard, M. J. Grubman, and P. W. Mason. 1998. Construction and evaluation of an attenuated vaccine for foot-and-mouth disease: difficulty adapting the leader proteinase-deleted strategy to the serotype O1 virus. *Virus Res.* **55**:49–60.
- Baranowski, E., N. Molina, J. I. Núñez, F. Sobrino, and M. Sáiz. 2003. Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. *J. Virol.* **77**:11290–11295.
- Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdager, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck, and E. Domingo. 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* **72**:6362–6372.
- Beard, C., G. Ward, E. Rieder, J. Chinsangaram, M. J. Grubman, and P. W. Mason. 1999. Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J. Biotechnol.* **73**:243–249.
- Belsham, G. J., and E. Martínez-Salas. 2004. Genome organisation, translation and replication of FMDV RNA, p. 19–52. *In* F. Sobrino and E. Domingo (ed.), *Foot-and-mouth disease: current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- Benvenisti, L., A. Rogel, L. Kuznetsova, S. Bujanover, Y. Becker, and Y. Stram. 2001. Gene gun-mediated DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **19**:3885–3895.
- Blanco, E., L. J. Romero, M. El Harrach, and J. M. Sánchez-Vizcaíno. 2002. Serological evidence of FMD subclinical infection in sheep population during the 1999 epidemic in Morocco. *Vet. Microbiol.* **85**:13–21.
- Blaney, J. E., Jr., A. P. Durbin, B. R. Murphy, and S. S. Whitehead. 2006. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol.* **19**:10–32.
- Brown, D. M., C. T. Cornell, G. P. Tran, J. H. Nguyen, and B. L. Semler. 2005. An authentic 3′ noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J. Virol.* **79**:11962–11973.
- Bullido, R., N. Doménech, B. Alvarez, F. Alonso, M. Babín, A. Ezquerro, E. Ortuño, and J. Domínguez. 1997. Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and cross-reactivity studies with leukocytes of domestic animals. *Dev. Comp. Immunol.* **21**:311–322.
- Bullido, R., A. Ezquerro, F. Alonso, M. Gómez del Moral, and J. Domínguez. 1996. Characterization of a new monoclonal antibody (4B7) specific for porcine MHC (SLA) class I antigens. *Investig. Agrar. Prod. Sanid. Anim.* **11**:29–37.
- Carrillo, C., E. R. Tulman, G. Delhon, Z. Lu, A. Carreno, A. Vagnozzi, G. F. Kutish, and D. L. Rock. 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **79**:6487–6504.
- Cedillo-Barron, L., M. Foster-Cuevas, G. J. Belsham, F. Lefevre, and R. M. Parkhouse. 2001. Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **82**:1713–1724.
- Chinsangaram, J., P. W. Mason, and M. J. Grubman. 1998. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **16**:1516–1522.
- Collen, T. 1994. Foot-and-mouth disease (aphthovirus): viral T cell epitopes. *In* B. M. L. Goddeeris and I. Morrison (ed.), *Cell mediated immunity in ruminants*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Cubillos, C., B. G. de la Torre, A. Jakab, G. Clementi, E. Borrás, J. Barcena, D. Andreu, F. Sobrino, and E. Blanco. 2008. Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J. Virol.* **82**:7223–7230.
- Dobrikova, E., P. Florez, S. Bradrick, and M. Gromeier. 2003. Activity of a type 1 picornavirus internal ribosomal entry site is determined by sequences within the 3′ nontranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:15125–15130.
- Donaldson, A. 2004. Clinical signs of foot-and-mouth disease, p. 93–102. *In* F. Sobrino and E. Domingo (ed.), *Foot-and-mouth disease: current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- Durbin, A. P., R. A. Karron, W. Sun, D. W. Vaughn, M. J. Reynolds, J. R. Perreault, B. Thumar, R. Men, C. J. Lai, W. R. Elkins, R. M. Chanock, B. R. Murphy, and S. S. Whitehead. 2001. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3′-untranslated region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**:405–413.
- Eblé, P. L., A. Bouma, K. Weerdmeester, J. A. Stegeman, and A. Dekker. 2007. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine* **25**:1043–1054.
- Escarmís, C., M. Toja, M. Medina, and E. Domingo. 1992. Modifications of the 5′ untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res.* **26**:113–125.
- Ferris, N. P., D. P. King, S. M. Reid, G. H. Hutchings, A. E. Shaw, D. J. Paton, N. Goris, B. Haas, B. Hoffmann, E. Brocchi, M. Bugnetti, A. Dekker, and K. De Clercq. 2006. Foot-and-mouth disease virus: a first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.* **117**:130–140.
- Fowler, V. L., D. J. Paton, E. Rieder, and P. V. Barnett. 2008. Chimeric foot-and-mouth disease viruses: evaluation of their efficacy as potential marker vaccines in cattle. *Vaccine* **26**:1982–1989.
- Francis, M. J., and L. Black. 1983. Antibody response in pig nasal fluid and serum following foot-and-mouth disease infection or vaccination. *J. Hyg. (London)* **91**:329–334.
- Ganges, L., M. Barrera, J. I. Núñez, I. Blanco, M. T. Frías, F. Rodríguez, and F. Sobrino. 2005. A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine* **23**:3741–3752.
- García-Briones, M. M., E. Blanco, C. Chiva, D. Andreu, V. Ley, and F. Sobrino. 2004. Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology* **322**:264–275.
- Herrera, M., A. Grande-Pérez, C. Perales, and E. Domingo. 2008. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J. Gen. Virol.* **89**:232–244.
- Hunziker, I. P., S. Harkins, R. Feuer, C. T. Cornell, and J. L. Whitton. 2004. Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge. *Virology* **330**:196–208.
- Jensen, M. J., and D. M. Moore. 1993. Phenotypic and functional characterization of mouse attenuated and virulent variants of foot-and-mouth disease virus type O1 Campos. *Virology* **193**:604–613.
- Kitching, R. P. 2005. Global epidemiology and prospects for control of foot-and-mouth disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **288**:133–148.
- Kofler, R. M., J. H. Aberle, S. W. Aberle, S. L. Allison, F. X. Heinz, and C. W. Mandl. 2004. Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:1951–1956.
- Leitner, W. W., L. N. Hwang, M. J. deVeer, A. Zhou, R. H. Silverman, B. R. Williams, T. W. Dubensky, H. Ying, and N. P. Restifo. 2003. Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat. Med.* **9**:33–39.
- Lewis, S. A., D. O. Morgan, and M. J. Grubman. 1991. Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J. Virol.* **65**:6572–6580.
- López de Quinto, S., M. Sáiz, D. de la Morena, F. Sobrino, and E. Martínez-Salas. 2002. IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3′-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res.* **30**:4398–4405.
- Martínez-Salas, E., and O. Fernández-Miragall. 2004. Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr. Pharm. Des.* **10**:3757–3767.
- Mason, P. W., S. V. Bezborodova, and T. M. Henry. 2002. Identification and characterization of a cis-acting replication element (*cre*) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **76**:9686–9694.
- Mateu, M. G., E. Rocha, O. Vicente, F. Vayreda, C. Navalpotro, D. Andreu, E. Pedrosa, E. Giral, L. Enjuanes, and E. Domingo. 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **8**:261–274.
- McCullough, K. C., and F. Sobrino. 2004. Immunology of foot-and-mouth disease, p. 173–222. *In* F. Sobrino and E. Domingo (ed.), *Foot-and-mouth disease: current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- McKenna, T. S., J. Lubroth, E. Rieder, B. Baxt, and P. W. Mason. 1995. Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J. Virol.* **69**:5787–5790.
- Melchers, W. J., J. G. Hoenderop, H. J. Bruins Slot, C. W. Pleij, E. V. Pilipenko, V. I. Agol, and J. M. Galama. 1997. Kissing of the two predominant hairpin loops in the coxsackie B virus 3′ untranslated region is the

- essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **71**:686–696.
43. Merkle, L., M. J. van Ooij, F. J. van Kuppeveld, D. H. Glaudemans, J. M. Galama, A. Henke, R. Zell, and W. J. Melchers. 2002. Biological significance of a human enterovirus B-specific RNA element in the 3' nontranslated region. *J. Virol.* **76**:9900–9909.
  44. Pacheco, J. M., M. C. Brum, M. P. Moraes, W. T. Golde, and M. J. Grubman. 2005. Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. *Virology* **337**:205–209.
  45. Pilipenko, E. V., S. V. Maslova, A. N. Sinyakov, and V. I. Agol. 1992. Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res.* **20**:1739–1745.
  46. Pilipenko, E. V., K. V. Poperechny, S. V. Maslova, W. J. Melchers, H. J. Slot, and V. I. Agol. 1996. Cis-element, oriR, involved in the initiation of (–) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *EMBO J.* **15**:5428–5436.
  47. Pugachev, K. V., F. Guirakhoo, D. W. Trent, and T. P. Monath. 2003. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int. J. Parasitol.* **33**:567–582.
  48. Rodríguez Pulido, M., P. Serrano, M. Sáiz, and E. Martínez-Salas. 2007. Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* **364**:466–474.
  49. Sa-Carvalho, D., E. Rieder, B. Baxt, R. Rodarte, A. Tanuri, and P. W. Mason. 1997. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**:5115–5123.
  50. Sáiz, J. C., A. Rodríguez, M. González, F. Alonso, and F. Sobrino. 1992. Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins. *J. Gen. Virol.* **73**:2601–2607.
  51. Sáiz, M., D. B. De La Morena, E. Blanco, J. I. Núñez, R. Fernández, and J. M. Sánchez-Vizcaino. 2003. Detection of foot-and-mouth disease virus from culture and clinical samples by reverse transcription-PCR coupled to restriction enzyme and sequence analysis. *Vet. Res.* **34**:105–117.
  52. Sáiz, M., S. Gómez, E. Martínez-Salas, and F. Sobrino. 2001. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J. Gen. Virol.* **82**:93–101.
  53. Sáiz, M., J. I. Núñez, M. A. Jiménez-Clavero, E. Baranowski, and F. Sobrino. 2002. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect.* **4**:1183–1192.
  54. Sanz-Parra, A., M. A. Jiménez-Clavero, M. M. García-Briones, E. Blanco, F. Sobrino, and V. Ley. 1999. Recombinant viruses expressing the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology* **259**:129–134.
  55. Serrano, P., M. Rodríguez Pulido, M. Sáiz, and E. Martínez-Salas. 2006. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J. Gen. Virol.* **87**:3013–3022.
  56. Sobrino, F., M. Sáiz, M. A. Jiménez-Clavero, J. I. Núñez, M. F. Rosas, E. Baranowski, and V. Ley. 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* **32**:1–30.
  57. Taboga, O., C. Tami, E. Carrillo, J. I. Núñez, A. Rodríguez, J. C. Sáiz, E. Blanco, M. L. Valero, X. Roig, J. A. Camarero, D. Andreu, M. G. Mateu, E. Giralt, E. Domingo, F. Sobrino, and E. L. Palma. 1997. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.* **71**:2606–2614.
  58. Todd, S., J. S. Towner, D. M. Brown, and B. L. Semler. 1997. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J. Virol.* **71**:8868–8874.
  59. van Ooij, M. J., C. Polacek, D. H. Glaudemans, J. Kuijpers, F. J. van Kuppeveld, R. Andino, V. I. Agol, and W. J. Melchers. 2006. Polyadenylation of genomic RNA and initiation of antigenomic RNA in a positive-strand RNA virus are controlled by the same cis-element. *Nucleic Acids Res.* **34**:2953–2965.
  60. Vassilev, V. B., L. H. Gil, and R. O. Donis. 2001. Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhea virus. *Vaccine* **19**:2012–2019.
  61. Wang, C. Y., T. Y. Chang, A. M. Walfield, J. Ye, M. Shen, S. P. Chen, M. C. Li, Y. L. Lin, M. H. Jong, P. C. Yang, N. Chyr, E. Kramer, and F. Brown. 2002. Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine* **20**:2603–2610.
  62. Witwer, C., S. Rauscher, I. L. Hofacker, and P. F. Stadler. 2001. Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res.* **29**:5079–5089.
  63. Zheng, M., N. Jin, H. Zhang, M. Jin, H. Lu, M. Ma, C. Li, G. Yin, R. Wang, and Q. Liu. 2006. Construction and immunogenicity of a recombinant fowl-pox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods* **136**:230–237.
  64. Zoll, J., H. A. Heus, F. J. van Kuppeveld, and W. J. Melchers. 2009. The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Res.* **139**:209–216.